

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kärt Ukkivi

**Transkriptsiooni ja transkriptsiooniga seotud DNA reparatsiooni
mõju mutatsiooniprotsessidele bakteris *Pseudomonas putida***

Magistritöö

Juhendaja Ph.D. Maia Kivisaar

TARTU 2013

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Bakteri kromosoom	7
1.1.1 Bakteri kromosoomi replikatsioon	10
1.1.2 Transkriptsioon ja selle mõju replikatsioonile	13
1.2 Transkriptsioon ja reparatsioon	15
1.2.1. TC-NER.....	15
1.2.2 Mfd	16
2. Eksperimentaalosa	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja metoodika	21
2.2.1 Söötmed, bakteritüved, plasmiidid.....	21
2.2.2 Raaminihkemutatsioone tuvastava testsüsteemi P_{tac} - <i>pheA</i> +C konstrueerimine ja viimine <i>P. putida</i> kromosoomi	23
2.2.3 <i>mfd</i> geeni deletsiooniga <i>P. putida</i> tüvede konstrueerimine	24
2.2.4 NER valkude suhtes defektsete tüvede konstrueerimine	26
2.2.5 Plasmiidse DNA eraldamine „Axygen“ kitiga ja restriksioonanalüüs.....	26
2.2.6 Bakterite konjugatsioon.....	27
2.2.7 Bakterite elektroporatsioon.....	27
2.2.8 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon).....	28
2.2.9 Gelelektroforees	31
2.2.10 ARB-PCR ja DNA sekveneerimine	31
2.2.11 <i>lacI</i> - P_{tac} - <i>pheA</i> +C ja <i>lacI</i> - P_{tac} - <i>pheBA</i> geenikassetiga <i>P. putida</i> rakkudes toimuvate mutatsioonide tekkesageduse määramine	32
2.2.12 <i>P. putida</i> rakkudes toimuvate mutatsioonide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga	33
2.2.13 <i>P. putida</i> Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine	33
2.2.14 <i>P. putida</i> populatsiooni elumuse määramine fenooli-minimaalsöötmelt	34
2.2.15 Rakulüsaatide valmistamine valkude eraldamiseks	34
2.2.16 Valkude kontsentratsiooni määramine	34
2.2.17 Western blot analüüs	35

2.2.18 DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test	35
2.2.19 Rekonstruktsiooni katse	36
2.2.20 Mutatsioonisageduste võrdlus kasutades ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja Tukey testi	36
2.3 Tulemused	37
2.3.1 Transkriptsiooni mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri <i>P. putida</i> kromosoomis, kasutades raaminihkmutatsioone detekteerivat testsüsteemi	37
2.3.2 Mfd mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri <i>P. putida</i> kromosoomis, kasutades raaminihkmutatsioone detekteerivat testsüsteemi	40
2.3.3 TC-NER mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri <i>P. putida</i> kromosoomis, kasutades raaminihkmutatsioone detekteerivat testsüsteemi	44
2.3.4 <i>mfd</i> mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri <i>P. putida</i> kromosoomis, kasutades testsüsteemi, mis võimaldab tuvastada erinevat tüüpi mutatsioone	45
2.3.5 <i>mfd</i> mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteris <i>P. putida</i> , kasutades plasmiidset testsüsteemi	48
2.3.6 Mfd ja NER-i valkude koosmõju uurimine mutatsioonisagedusele <i>P. putida</i> rakkudes, kasutades plasmiidset testsüsteemi TAG	49
2.3.7 Mfd ja NER valkude mõju DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvusele	51
2.4 Arutelu	53
Kokkuvõte	57
Resume	59
Tänuõnad	61
Kasutatud kirjandus	62
Kasutatud veebiaadressid	68
Lisa 1. <i>mfd</i> deleteerimise joonis Podfai jt. (1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodiga.	69
Lisa 2. P_{tac} - <i>pheA</i> +C testsüsteemi sisaldavate tüvede keskmised Phe^+ mutantide arvud 1×10^7 raku kohta ning 95% usalduspiirid.	70
Lisa 3. Publikatsioon	72

Kasutatud lühendid

ADP - adenosiindifosfaat

Amp - ampitsilliin

ATP - adenosiintrifosfaat

CAA - *casamino acids*

Cb - karbenitsilliin

CFU – kolooniaid moodustavate rakkude arv (*colony forming unit*)

DNAP - DNA polümeraas

dsDNA - kaheaahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

Fis - *factor for inversion stimulation*

Glc - glükoos

H-NS - *histone-like nucleoid structuring*

HU - *histone-like protein from E. coli strain U93*

IHF - *integration host factor*

IPTG - *isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid*

kb - kilobase

kDa - kilodalton

Km - kanamütsiin

LB - lüsogeenne puljong/sööde (*lysogenic broth*)

Mfd - *mutation frequency decline*

MMC - mitomütsiin C

MMS - metüülmetaansulfonaat

NAP - nukleoidiga assotsieeruv valk (*nucleoid-associated protein*)

NER - nukleotiidide väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*)

nt - nukleotiid

NQO – 4-nitrokinoliin N-oksiid

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon

Pol - polümeraas

Phe - fenool

Rif - rifampitsiin

RID - RNA polümeraasiga interakteeruv domään (*RNAP interacting domain*)

RNAP - RNA polümeraas

SMC - *structural maintenance of chromosome*, suured kompleksid, mis osalevad kromosoomi kokku pakkimises

SSB - *single-strand binding protein*

ssDNA - üheaahelaline DNA (*single-stranded DNA*)

TC-NER - transkriptsiooniga seotud nukleotiidide väljalõike reparatsioon (*transcription coupled nucleotide excision repair*)

TCR - transkriptsiooniga seotud reparatsioon (*transcription coupled repair*)

Tel - K-telluriit

Tet - tetratsükliin

TRCF - transkriptsiooni reparatsiooniga seotud faktor (*transcription-repair coupling factor*)

TS - *target sequence*

Sissejuhatus

Bakterites toimuvad genoomi replikatsioon ja transkriptsioon samal ajal, kuid erineva kiirusega - replisoom liigub transkriptsioonikompleksist umbes 12-30 korda kiiremini. Selle tulemusena võivad RNA polümeraas ja replisoom omavahel kokku põrgata. Kokkupõrked võivad toimuda kas transkriptsiooni ja replikatsiooni samasuunalisel või vastassuunalisel liikumisel. Hoolimata sellest, et mõlemal kokkupõrkel on mõju replikatsioonikahvlile, mõjutab vastassuunaline ehk „pea-ees“ kokkupõrge replikatsioonikahvli liikumist rohkem. Arvatakse, et replikatsiooni- ning transkriptsioonikomplekside vastassuunaline kokkupõrge ning geenide suurem transkriptsioonitase võiksid suurendada ka mutatsioonisagedust.

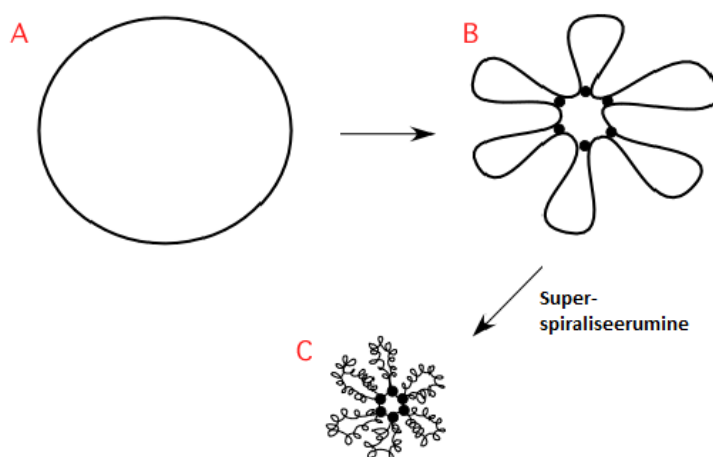
Replikatsiooni ja transkriptsiooni kokkupõrgete ära hoidmiseks ja nende mõju vähendamiseks on bakterites spetsiaalne transkriptsiooni reparatsiooniga siduv faktor Mfd. Mfd tunneb ära DNA-l peatunud RNA polümeraasi ja toimib sõltuvalt peatumise põhjusest erinevalt: 1) lükkab RNA polümeraasi edasi ja soodustab RNA elongatsiooni jätkamist; 2) kui RNA polümeraas on peatunud vea tõttu DNA-l, lükkab polümeraasi DNA-lt maha ning suunab vigasele kohale nukleotiidide väljalõike reparatsiooni (NER). Kuigi Mfd osaleb transkribeeritava ahela reparatsioonis, suurendab Mfd olemasolu osades bakterites mutatsioonisagedust. Meie töörühmas on varem näidatud, et ka NER-i ensüümid soodustavad mutatsioonide teket (Tark jt., 2008). Käesolevas töös on uuritud mehhanisme, mis on seotud transkriptsiooni mõjuga mutatsioonisagedusele ning Mfd ja NER-i valkude interaktsioone mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida*.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Bakteri kromosoom

Enamasti on bakteri kromosoomiks tsirkulaarne DNA molekul. Kromosoom on rakust ligikaudu 1000 korda pikem ning selleks, et kromosoom rakku ära mahuks, peab see olema kokku pakitud nii, et moodustuv struktuur oleks kompaktne, kuid võimaldaks samas genoomi replikatsiooni ja geenide ekspressiooni (Thanbichler jt, 2005). Näiteks *Escherichia coli* kromosoom koosneb umbes 4,7 miljonist aluspaarist ning on 1,5 mm pikk (Stavans ja Oppenheim, 2006; Trun ja Marko, 1998), rakk ise on aga tavaliselt 2 μm pikk.

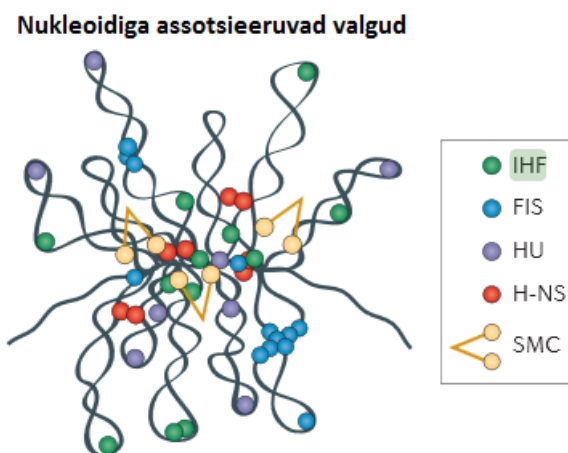
Bakterirakus olevat ala, kus asub kokkupakitud kromosoom, kutsutakse nukleoidiks. Nukleoid koosneb RNA-st, valkudest ja DNA-st, mis bakteris *E. coli* moodustab nukleoidi massist kõigest ~ 3 % (Reyes-Lamothe jt, 2008). Nukleoidis on kromosoom esmalt kokku pakitud domäänideks, mida hoiavad koos valgud (joonis 1B). Sellele järgneb domäänide superspiraliseerumine, milles osalevad topoisomeraasid - güraas ja topoisomeraas I (joonis 1C). Güraas põhjustab DNA negatiivset superspiraliseerumist ning topoisomeraas I osaleb õige spiraliseerumisastme tekitamises, takistades liigset lingude teket (Drlica, 1992). Superspiraliseerunud domäänid on omakorda kondenseerunud 800-1000 kb suurusteks regioonideks (makrodomäänid), mis lokaliseeruvad rakus kindlas kohas (Lin jt., 1997; Niki jt., 2000; Wu ja Errington, 2002).



Joonis 1. Kromosoomi pakkimine (joonis muudetult <http://tinyurl.com/c4rcb6n>). (A) Tsirkulaarne kromosoom. (B) DNA on valkude vahendusel pakitud kromosomaalseteks

domäänideks, millede arv on bakterites erinev. Valgud, mis interakteeruvad DNA-ga ning omavahel, on kujutatud mustade ringidena. (C) Domäänide superspiraliseerumine.

DNA painutamisel ning DNA-ga seotud protsesside mõjutamisel osalevad bakterites histoonidega funktsioonilt sarnased nukleoidiga assotsieeruvad valgud ehk NAP-id (*nucleoid-associated proteins*). Lisaks DNA struktuuri muutmisele ja painutamisele on mitmed NAP-id võimelised transkriptsiooni soodustama või inhibeerima. Neli olulisemat NAP-i on HU (*histone-like protein from E. coli strain U93*), IHF (*integration host factor*), Fis (*factor for inversion stimulation*) ja H-NS (*histone-like nucleoid structuring*) (joonis 2).



Joonis 2. Skemaatiline ülevaade nukleoidiga assotsieeruvatest valkudest (joonis muudetult Wang jt., 2013). Nukleoidiga assotsieeruvad valgud ehk NAP-id osalevad DNA painutamisel ja kromosomaalsete lookuste kokku toomisel. SMC - (*structural maintenance of chromosome*) suured kompleksid, millede kromosoomi organiseerimise ja kokkusurumise mehhanism on veel teadmata.

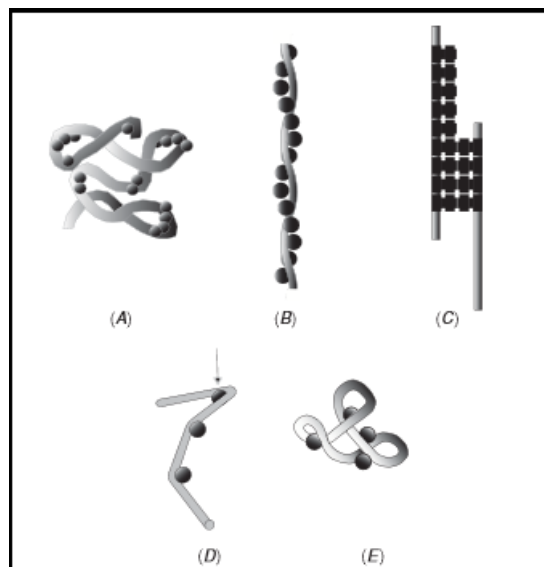
HU on väike 18 kDa valk, mis koosneb kahest subühikust, HU α ja HU β , ning võib moodustada nii homo- kui ka heterodimeere. Näiteks bakteris *E. coli* sõltub homo- või heterodimeeride moodustumine bakterite kasvufaasist (Claret ja Rouviere-Yaniv, 1997). HU seondumine DNA-ga on mittespetsiifiline, kuid eelistatud on katked ja ühe või kahe nukleotiidsed tühimikud, mis vihib ka võimalikule osalusele reparatsioonis (Castaing jt., 1995). HU osaleb DNA topoloogia haldamises, interakteerudes topoisomeraas I-ga ja mõjutades superheeliksate moodustumist (Broyles ja Pettijohn, 1986). HU mõju DNA painutamisele sõltub tema kontsentratsioonist - madalal HU kontsentratsioonil seonduvad dimeerid kooperatiivselt ja painutavad DNA-d (joonis 3A), kõrgel kontsentratsioonil aga

moodustavad DNA ahela ümber helikaalse struktuuri ja vähendavad paindlikkust (Sagi jt, 2004) (joonis 3B).

IHF on struktuurilt ja järjestuselt HU-ga sarnane valk, kuid erineb seondumise ja funktsiooni poolest. IHF seondub DNA-l spetsiifilisele järjestusele, milleks on konsensusjärjestus WATCARXXXXTTR (W on A/T; X on A/T/C/ G; R on A/G) ja painutab seda umbes 160°, tekitades U-pöörde (Rice jt, 1996) (joonis 3D). Lisaks on IHF võimeline seonduma ka mitte-spetsiifiliselt (seondumine nõrgem) ning sellisel juhul osaleb ta DNA kokku pakkimises (Jaffar jt, 2001).

H-NS on globaalne regulaator ja ta kontrollib üle 200 geeni ekspressiooni, millest enamus on seotud keskkonna vastusega (Dorman, 2004). Valgu N-terminuses on dimeeriseerumise domään, mis võimaldab tekitada silla kahe DNA segmendi vahel (Rimsky, 2004). Lisaks võib H-NS moodustada ka oligomeere ja sel viisil siduda kokku üksteisest kaugel asuvaid DNA segmente (Dame jt., 2002), osaledes DNA tihendamises ja nukleoidi moodustamises (joonis 3C).

Ka Fis on globaalne regulaator, mis osaleb lisaks DNA replikatsioonile ja rekombinatsioonile ka transkriptsiooni regulatsioonis. Fis võib DNA-ga seonduda spetsiifiliselt või mitte-spetsiifiliselt ning sõltuvalt seondumissaidi järjestusest tekitab Fis DNA-s 50° kuni 90° painde, moodustades DNA linge (Pan jt., 1996) (joonis 3E).



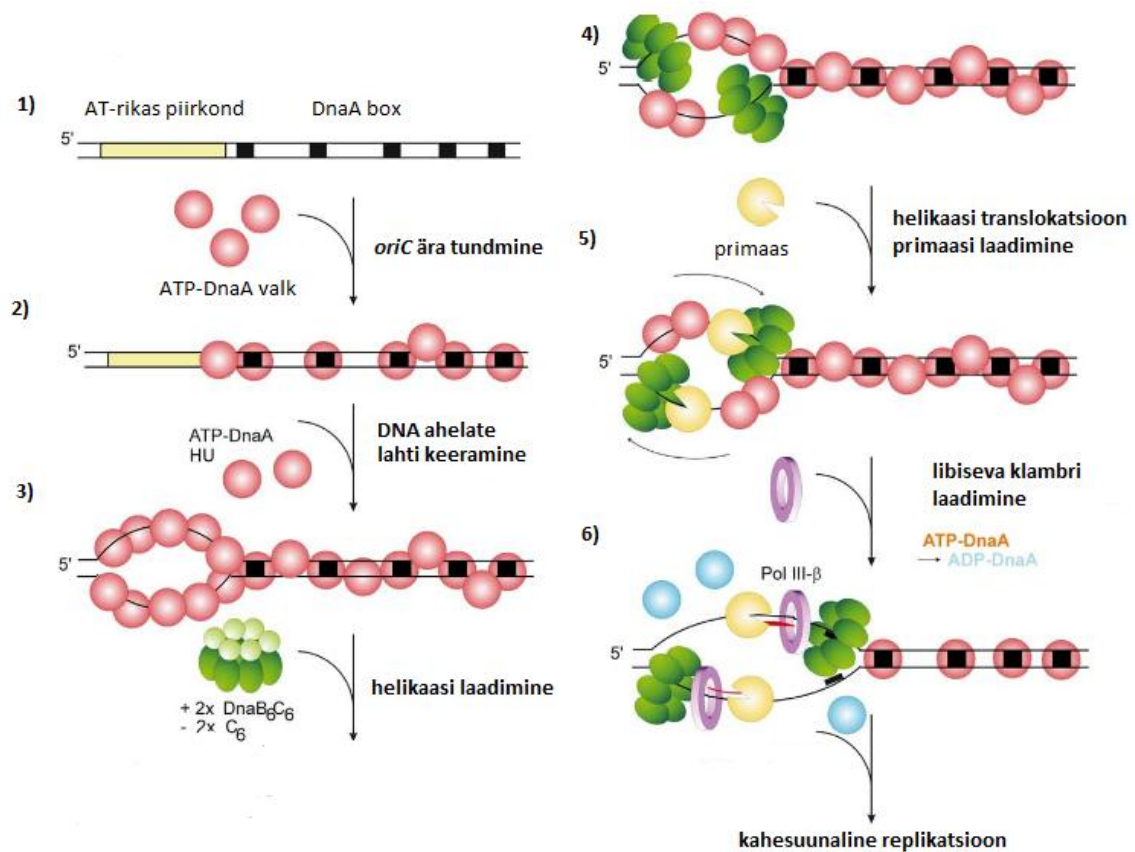
Joonis 3. NAP-DNA komplekside skemaatilised mudelid (joonis muudetult Stavans ja Oppenheim, 2006). (A) HU dimeerid seonduvad DNA-ga kooperatiivselt ja madalal

kontsentratsioonil pakivad DNA kokku. Iga HU dimeer tekitab väikese lokaalse painde. (B) Kõrgel kontsentratsioonil moodustab HU ümber DNA heeliksilaadse kompleksi. (C) H-NS moodustab kaugete DNA segmentide vahel silla ja katab kaheaahelalist DNA-d. (D) IHF tekitab umbes 160° painde järjestuse-spetsiifilises saidis (märgitud noolega) ning väiksemaid paindeid mitte-spetsiifilistes saitides. (E) Fis dimeerid seonduvad ja painutavad DNA-d, moodustades linge.

Kuigi tänaseks on kromosoomi topoloogiast palju teada, on veel mitmeid aspekte, mis on segased või teadmata. Näiteks on vähe teada faktoritest, mis vastutavad superspiraliseerunud domäänide piiride tekitamise eest ning domäänide suuruse ja arvu eest. Ka ei teata jätkuvalt paljude valkude täpset rolli kromosoomi pakkimises ja kromosoomiga seotud funktsioonides.

1.1.1 Bakteri kromosoomi replikatsioon

Bakterite rakutsükli keskne sündmus on kromosoomi replikatsiooni initsiatsioon, mis on täpselt kontrollitud ja toimub kiiresti kasvavates rakkudes korduvalt. Initsiatsioon määrab ära DNA sünteesi üldise määra, aitab koordineerida DNA replikatsiooni ja DNA segregatsiooni, rakkude kasvu ning jagunemist. Bakterites algab replikatsiooni initsiatsioon kromosoomil ühest kohast, milleks on replikatsiooni alguspunkt *oriC* (Messer, 2002). *E. coli* 260 aluspaari pikkusel *oriC* alal on viis initsiaatorvalgu DnaA seondumissaiti, millest vasakul on kolm 13 nukleotiidilist kordust ning AT-rikas regioon (Bramhill ja Kronberg, 1988). Initsiatsioon algab initsiaatorkompleksi moodustumisega. Selleks seondub DnaA-ATP (aktiivne vorm) kompleks *oriC*-le, põhjustades DNA ahelate lahknemise ja DNA muli moodustumise. Järgnevalt toimub DnaA vahendatud helikaasi DnaB ja helikaasi laadija DnaC asetamine avatud üheaahelalise ehk ssDNA ahelatele (Carr ja Kaguni, 2001; Fang jt., 1999). Kohe peale DnaB laadimist või sellega samal ajal lahkub DnaC ning tulemusena kaasneb DnaB-l ATP hürdolüüs. See aktiveerib DnaB helikaasse aktiivsuse (Wahle jt., 1989) ning erinevatel DNA ahelatel olevad DnaB heksameerid liiguvad üksteisest mööda 5'-3' suunas ja laiendavad ssDNA muli (Fang jt., 1999). Järgnevalt liitub DnaA-DnaB kompleksiga primaas (DnaG) ja sünteesib DNA ahelatele RNA praimerid. Seejärel laaditakse ssDNA ahelatele DNA polümeraas III (Pol III) ja β -subühikutest dimeer, mis moodustab DNA ahelate ümber libiseva klambri (Kelman ja O'Donnell, 1995). Selle tagajärjel aktiveerub DnaA ATPaasne aktiivsus, valk inaktiveerub, lahkub DNA ahelalt ja edasine replikatsiooni initsiatsioon on takistatud (Katayama jt., 1998; Katayama ja Sekimizu, 1999) (joonis 4).

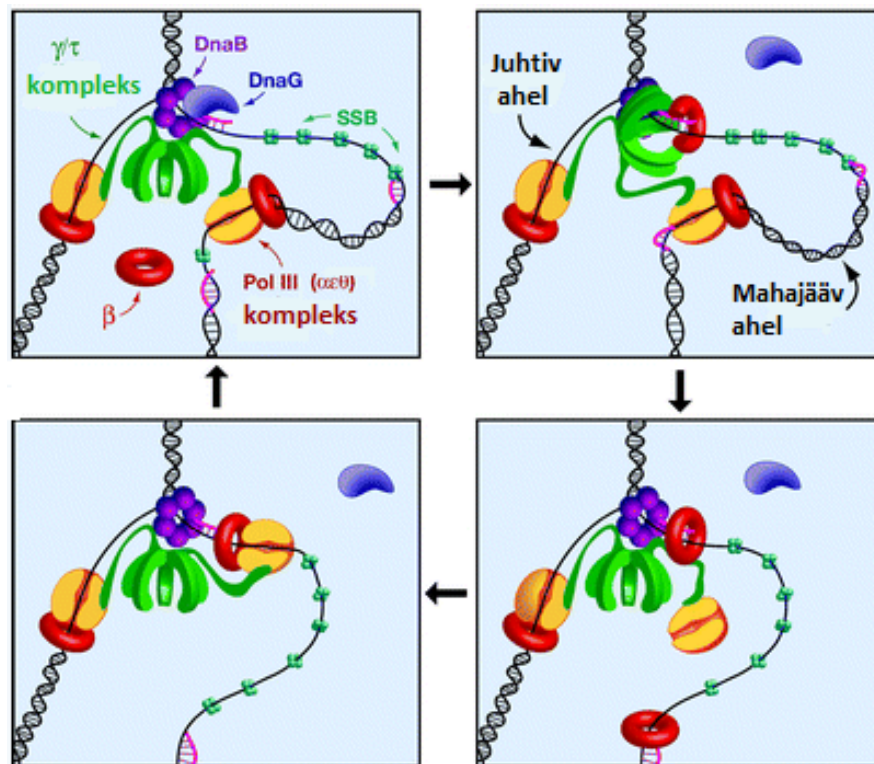


Joonis 4. Replikatsiooni initsiatsioon bakteris *E. coli* (joonis muudetult Messer, 2002).

1) ATP-DnaA valk tunneb ära seondumiskoha *oriC*-l. 2) ATP-DnaA seondumine DNA-le. 3) DNA ahelate lahti keeramine ning helikaasi DnaB ja sellega seondunud helikaasi laadija DnaC laadimine ssDNA ahelatele. 4) DnaB heksameeride liikumine 5'-3' suunas ning DNA ahelate lahti keeramine ja primaasi laadimine. 5) Primaas sünteesib ssDNA ahelatele praimerid ja toimub libiseva klambri ning DNA Pol III laadimine. 6) Inaktiivses vormis DnaA-ADP lahkeb ahelalt ning replikatsioonikahvlid alustavad liikumist erinevates suundades.

Bakterites toimub kromosoomi replikatsioon kahes suunas ehk üks replikatsioonikahvel liigub *oriC*-st vasakule ning teine paremale. Kromosoomi replikatsiooni elongatsiooni viib läbi kompleks nimega replisoom. Replisoom koosneb helikaasist DnaB, mis keerab DNA ahelad lahti, primaasist DnaG, mis sünteesib RNA praimerid, ssDNA-d siduvast valgust SSB (*single-strand binding protein*), mis takistab DNA sekundaarstruktuuride moodustumist, ja DNA polümeraas III holoensüümi, mis sünteesib uued DNA ahelad (O'Donnell, 2006). Pol III holoensüüm koosneb kümnest valgust, mis jagunevad kolmeks funktsionaalseks üksuseks: 1) klambri laadija (γ/τ kompleks), 2) libisev β klamber ja 3) pol III apoensüüm. Pol III apoensüümi moodustavad DNA polümeraasse aktiivsusega α subühik, 3'-5' eksonukleaase aktiivsusega ϵ subühik, mis korrigeerib DNA

sünteesil tekkinud vigu, ja θ subühikud, mis stabiliseerivad ϵ eksonukleasi (McHenry ja Crow, 1979; Studwell-Vaughan ja O'Donnell, 1993; Taft-Benz ja Schaaper, 2004). Pol III apoensüüm üksi on aeglane ja madala protsessiivsusega ning vajab DNA sünteesi efektiivsuse suurendamiseks β klambrit (Johnson ja O'Donnell, 2005). Klambri laadija γ kompleks osaleb β klambri laadimises DNA-le (Turner jt. 1999) ning τ subühikud ühendavad klambri laadijaga kahte Pol III apoensüümi, mis viivad läbi juhtiva ja maha jääva ahela sünteesi, ning replikaasi helikaasiga DnaB (joonis 5). Replikatsiooni edenedes pikendatakse juhtivat ahelat pidevalt ning mahajääv ahel sünteesitakse 1-2 kb Okazaki fragmentidena. Esmalt sünteesib DNA primaas RNA praimerit, mida pikendab DNA polümeraas III. RNA praimerit eemaldab ning tühimiku sünteesib täis reparatsiooniline DNA polümeraas I ning kõrvuti olevate fragmentide 3'- ja 5'-otsade vahele sünteesib fosfodiestersideme DNA ligaas.



Joonis 5. *E. coli* replisoomi organisatsioon ja dünaamika (joonis muudetult Johnson ja O'Donnell, 2005). 1) DNA polümeraasi III holoensüümi organisatsioon; 2-4) Replisoomi edasi liikudes asetab klambri laadija (roheline) β klambri RNA praimerile (tähistatud roosaga), mille sünteesib DnaG (sinine tilk). Kui mahajääva ahela replikaas jõuab eelneva Okazaki fragmendini, lahkub see DNA-lt ning saab seonduda uue β klambri.

1.1.2 Transkriptsioon ja selle mõju replikatsioonile

Bakterites toimuvad replikatsioon ja transkriptsioon samal ajal ning kuna replikatsioon on 12-30 korda kiirem kui transkriptsioon, siis on DNA polümeraasi (DNAP) ja RNA polümeraasi (RNAP) kokkupõrked vältimatud. Kokkupõrgete tulemusena võidakse käivitada DNA kahjustuste vastus (SOS vastus), võivad tekkida kromosomaalsed deletsioonid ja mutatsioonid (Srivatsan jt., 2010; Vilette jt., 1996). Kokkupõrge võib toimuda kahel viisil: 1) DNA-l samas suunas liikuvate polümeraaside vahel ehk samasuunaline kokkupõrge; 2) üksteisele vastu liikuvate polümeraaside vahel ehk vastassuunaline või „pea-ees“ kokkupõrge. *In vivo* mõjutavad bakterites ja madalamates eukarüootides replikatsioonikahvli liikumist „pea-ees“ kokkupõrked rohkem kui samasuunalised kokkupõrked (Mirkin ja Mirkin, 2005). Seda toetab ka fakt, et kõrgelt ekspresseeruvad ja hädavajalikud geenid, näiteks rRNA operonid, on enamikes bakterites replikatsiooniga samas suunas (Guy ja Roten, 2004). Arvatakse, et replikatsioonikahvel on võimeline samas suunas liikuvast RNA polümeraasist mööduma või selle DNA-lt eemaldama (Mirkin ja Mirkin, 2005). Pomerantz ja O'Donnell (2008) on välja pakkunud, et *in vitro* samasuunalisel kokkupõrkel juhtiva ahela replikatsioon termineeritakse, kuid replisoom taastab sünteesi, kasutades mRNA-d praimerina. Esmalt eemaldab juhtiva ahela DNA polümeraas DNA-lt RNA polümeraasi. Järgnevalt hüppab polümeraas üle sünteesitud mRNA, jäädes ühendatuks klambri laadijaga, mis asetab RNA-DNA hübriidi 3'-terminusse uue libiseva klambri. DNA polümeraas III seondub uuele klambrile ning pikendab transkripti, jättes juhtivasse ahelasse katke. RNA lõigatakse välja ning asendatakse DNA-ga ja replikatsioon võib jätkuda. Erinevalt samasuunalisest kokkupõrkest mõjutab vastassuunaline kokkupõrge replikatsiooni tugevamalt ning mõju rakkudele paistab olevat korrelatsioonis geeni ekspressiooni tasemega (Pomerantz ja O'Donnell, 2010b). Vastassuunalise kokkupõrke tagajärjel võib replikatsioon peatuda ja võivad tekkida mutatsioonid (Srivatsan jt., 2010), deletsioonid (Vilette jt., 1996) ning kaheahelalised (dsDNA) katked, mis juhul kui neid ei parandata, viivad raku surmani. Kuigi on vihjeid, et replikatsioonikahvlid jäävad peale kokkupõrget püsima (Esnault jt., 2007; Maisnier-Patin, 2001; Pomerantz ja O'Donnell, 2010a), ei ole veel siiski teada, kuidas rakkudes kahe polümeraasi vastassuunaline kokkupõrge lahendatakse.

Lisaks aktiivselt transkribeerivatele RNA polümeraasidele kujutavad replikatsioonile ohtu ka DNA-l peatunud RNA polümeraasid. Elongeeruv RNAP peatub tihti regulatoorsete signaalide või vigade tõttu DNA-l (Rudolph jt., 2007; Uptain jt., 1997), mis tõttu suureneb RNAP-replisoomi kokkupõrgete risk. Peatunud polümeraasid võivad DNA-l tagasi liikuda, transkripti 3'-ots satub aktiivsaidist välja ning transkriptsioon ei saa jätkuda (Nudler jt.,

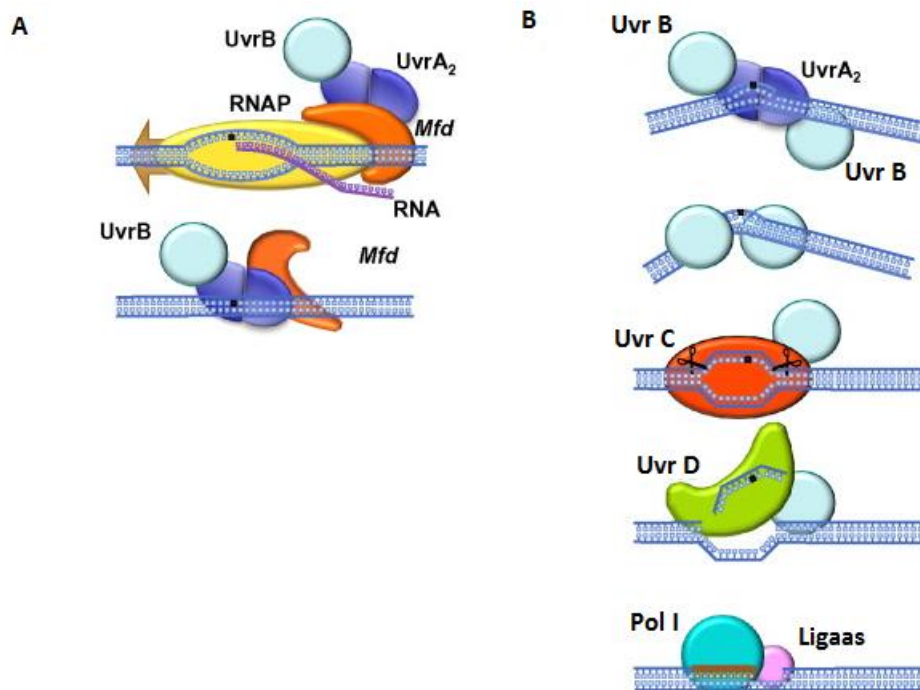
1997). Selle tulemusena võivad RNA polümeraasid üksteise taha kuhjuda ja moodustada stabiilse tõkke. Lisaks põhjustavad replikatsioonile probleeme ka transkriptsiooni initsiatsiooni kompleksid, mis on väga stabiilsed ja millede puhul on promootori piirkonnas DNA lahti sulanud ning toimub mitu abortiivset initsiatsiooni enne kui RNA polümeraas edasi liigub (Murakami jt., 2002).

1.2 Transkriptsioon ja reparatsioon

Rakkudele on eluliselt tähtis, et transkriptsioon toimuks korrektselt. Teoreetiliselt on isegi üks aktiivse geeni kodeerivas regioonis pöördumatult peatunud RNA polümeraas võimeline põhjustama raku surma (Svejstrup, 2002). Transkriptsiooni peatumise vältimiseks parandatakse vead transkribeeritavas ahelas umbes 10 korda kiiremini, kui ahelas, millel transkriptsiooni ei toimu (Bohr jt., 1985; Mellon ja Hanawalt, 1989). Vastavat protsessi nimetatakse TCR (*transcription coupled repair*) ja seda vahendavad transkriptsiooni reparatsiooniga seotud faktorid (TRCF, *transcription-repair coupling factors*), mis on võimelised eemaldama peatunud RNA polümeraasi, interakteeruma reparatsioonivalkudega ja käivitama vigase koha parandamise (Selby ja Sancar, 1993). Bakterites osalevad TCR-is valk Mfd (*mutation frequency decline*) ning transkriptsiooniga seotud nukleotiidide väljalõike reparatsioon ehk TC-NER (*transcription-coupled nucleotide excision repair*).

1.2.1. TC-NER

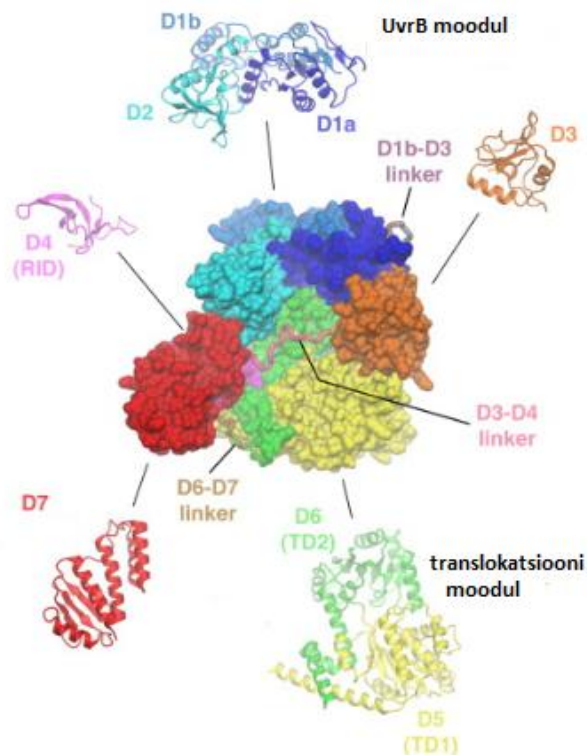
Nukleotiidide väljalõike reparatsioon jaguneb kaheks rajaks: 1) globaalne genoomne NER, mis parandab vigu kogu genoomil; 2) transkriptsiooniga seotud NER, mis parandab vigu transkribeeritaval ahelal. Need kaks rada erinevad teineteisest ainult vea äratundmise poolest. Joonisel 6 on näidatud radade erinevus ja vea eemaldamine. Globaalse NER-i puhul tunneb vea ära UvrA ja UvrB valkudest koosnev kompleks. TC-NER-i puhul osaleb vea leidmises bakteriaalne transkriptsiooni reparatsiooniga seotud faktor Mfd. Mfd tunneb ära DNA-l peatunud RNAP, seondub sellega ja lükkab RNAP DNA-lt maha (Park jt., 2002). Laialt levinud arvamus on, et järgnevas NER-i käivitamiseks on oluline Mfd interakteerumine UvrA valguga ja seeläbi UvrA₂B₍₂₎ kompleksi suunamine vigastatud kohale (Manelyte jt., 2010; Savery, 2007; Selby ja Sancar, 1993). Hetkel on veel teadmata, millal UvrA Mfd-le seondub. RNAP eemaldamisele järgneb UvrA dimeeri seondumine DNA-le ning selle painutamine ja Mfd vabanemine. Peale seda kui UvrB on kindlaks teinud DNA kahjustuse olemasolu, moodustub tugev UvrB:DNA kompleks ning UvrA dimeer vabaneb. UvrB-le seondub endonukleas UvrC, mis teeb mõlemale poole kahjustust sisselõiked (12-13 nt ala). Helikaas UvrD eemaldab kahjustusega fragmendi, DNA polümeraas I sünteesib tekkinud tühimiku täis ning ligaas katalüüsib fosfodiastersideme.



Joonis 6. TC- ja globaalse genoomse NER-i ülevaade bakteris *E. coli* (joonis muudetult Ganesan jt., 2012). A) TC-NER-ile spetsiifilised etapid. Mfd tunneb ära peatunud RNAP, vabastab selle ja transkripti ning interakteerub UvrA-ga. B) TC- ja globaalsele genoomsele NER-ile iseloomulikud etapid. UvrA₂ seondub DNA-le ja painutab seda, Mfd vabaneb. Peale vigastuse kinnitamist seonduvad UvrB monomeerid DNA-le ja moodustavad sellega tugeva kompleksi, UvrA₂ vabaneb. Järgnevalt seondub UvrB-DNA kompleksiga UvrC. Moodustub 12-13 nukleotiidine ssDNA mull ja UvrC teeb mõlemale poole vigastust lõike. Helikaas UvrD eemaldab oligonukleotiidid, tühimiku parandavad Pol I ning ligaas.

1.2.2 Mfd

Mfd või bakteriaalne TRCF on valk, mis seob otseselt replikatsiooni ja transkriptsiooni, osaledes reparatsioonis ning transkriptsiooni elongatsioonis. Mfd on ATPasse aktiivsusega suur valk (molekulmassiga 130 kDA), mis koosneb kaheksast struktuursest domäänist, mida ühendavad linkerid (joonis 7) (Deaconescu jt., 2006).

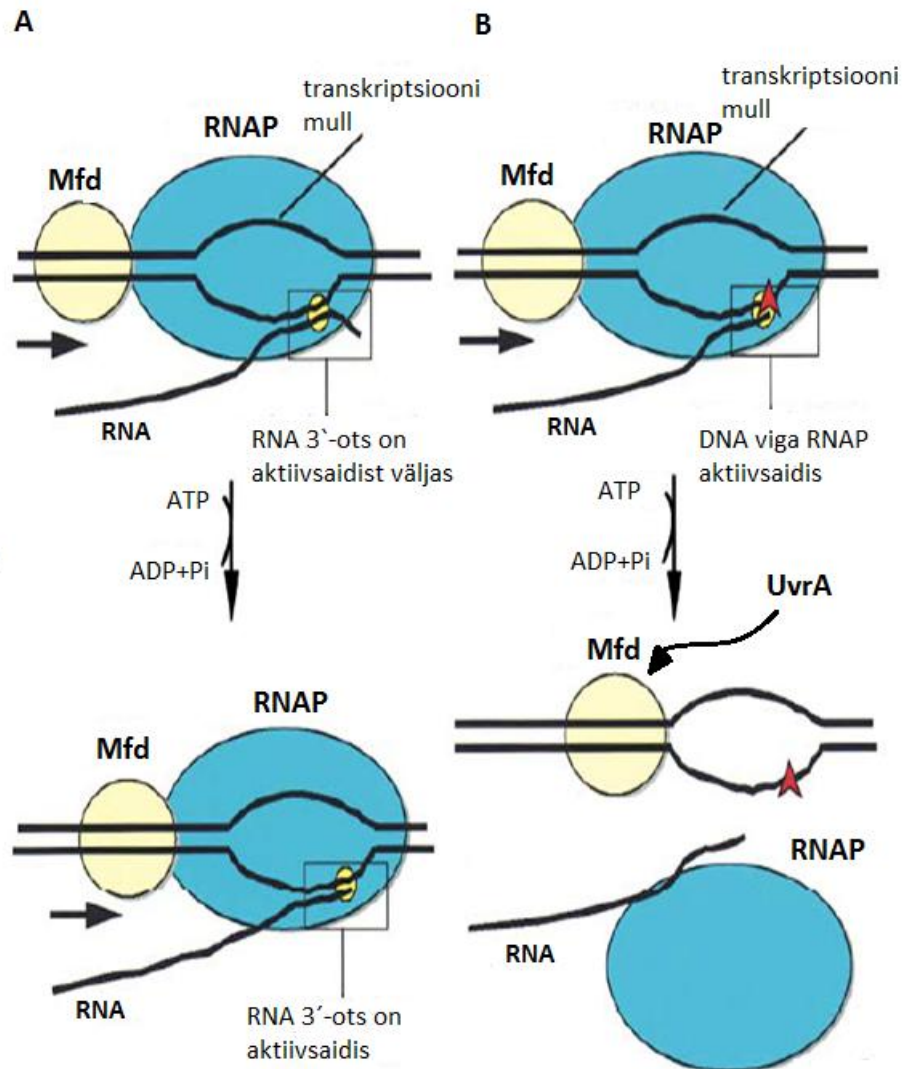


Joonis 7. *E. coli* TRCF struktuur (joonis muudetult Deaconescu jt., 2006).

Domäänid D1a, D1b ja D2 moodustavad UvrB mooduli, mis on sarnane NER raja UvrB valguga regiooniga, millele seondub UvrA (Selby ja Sancar, 1993). Domään D3 paistab olevat paindlik ning liigiti mitte-konserveerunud osa, mille funktsioon ei ole täpselt teada (Deaconescu jt., 2006). Domään D4 (RID, *RNAP interacting domain*) on vajalik RNA polümeraasiga interakteerumiseks (Westblade jt., 2010). Domäänid D5 ja D6 moodustavad translokatsiooni mooduli, millel on ATP-sõltuv DNA translokaasi aktiivsus (Deaconescu jt., 2006). Domään D7 moodustab koos D2 domääniga klambri, mis pärsib Mfd translokeerumise aktiivsust ja põhjustab autoinhibitsiooni (Murphy jt., 2009).

Mfd-1 on kaks toimemehhanismi: 1) ta lükkab peatunud RNA polümeraasi edasi ja soodustab RNA elongatsiooni (Park jt, 2002)(joonis 8A); 2) ta eemaldab DNA-lt peatunud RNAP, mis ei ole võimeline elongeeruma ja käivitab NER-i (Savery, 2007)(joonis 8B). Esimene neist mehhanismidest on kirjeldatud Park jt. 2002 aasta artiklis. Kui RNA polümeraas liigub DNA-l tagasi, satub tema 3'-ots aktiivsaidist välja ja RNAP ei ole võimeline elongatsiooni jätkama. Mfd seondub DNA-le RNAP-st ülesvoolu, milleks ta vajab umbes 20-30 nukleotiidilist vaba DNA lõiku, ning lükkab RNAP-d edasi. Nii satub RNA 3'-ots jälle aktiivsaiti ning elongatsioon saab jätkuda. Juhul kui RNAP peatub DNA-l, sest on leidnud vea, jääb ta sellel seisma ja varjab vigast kohta reparatsioonivalkude eest. Sel juhul tunneb Mfd peatunud polümeraasi ära, seondub selle ette ning lükkab RNAP-d nii kaua, kuni

see DNA-lt vabaneb (Park jt., 2002). Järgnevalt käivitab Mfd NER-i, interakteerudes NER-i raja valguga UvrA ning reparatsiooni rada läheb edasi nagu eelnevas peatükis kirjeldatud.



Joonis 8. Mfd toimemehhanismid (joonis muudetult Svejstrup, 2002). A) kui RNAP on DNA-l tagasi liikunud, kinnitub Mfd RNAP-st ülesvoolu ja lükkab seda edasi, nii et RNA 3'-ots satub tagasi RNAP aktiivsaiti ja elongatsioon saab jätkuda. 2) RNAP on peatunud vea tõttu DNA-l. Mfd lükkab polümeraasi, kuni see lahkub DNA-lt. Mfd-ga seondub UvrA ning käivitub NER.

Mfd mõju mutatsioonisagedusele võib liigiti erineda. *E. coli*-s on Mfd vajalik geenide ekspressiooni taastamiseks pärast UV-indutseeritud kahjustuste tekitamist ning osaleb kahjustuste parandamises, vähendades mutatsioonisagedust (Schalow jt., 2012). Inimese patogeenis *Campylobacter jejuni* osaleb Mfd jällegi mutatsioonide tekkes, põhjustades

antibiootikumide, näiteks fluorokinoloonide, resistentsust (Han jt., 2008). *mfd* geeni inaktiveerimine vähendab antibiootikumide resistentsust põhjustavate mutatsioonide sagedust umbes 100 korda ning *mfd* üleekspressioon suurendab seda (Han jt., 2008). Ka bakteris *Bacillus subtilis* osaleb *mfd* mutatsioonide tekkes - funktsionaalne Mfd valk on vajalik mutatsioonide tekkeks statsionaarses faasis (Ross jt., 2006).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Bakterites toimuvad replikatsioon ja transkriptsioon samal ajal ja erineva kiirusega, mistõttu põrkavad replisoom ja RNA polümeraas rakkudes pidevalt kokku. Arvatakse, et transkriptsiooni ja replikatsiooniaparaadi vastassuunaline kokkupõrge suurendab mutatsioonisagedust. Mutatsioonisagedus võiks suureneda ka märklaudgeeni transkriptsioonitaseme tõusu korral. Selleks, et kokkupõrgete mõju vähendada või neid ära hoida, on bakterites spetsiaalne valk Mfd. Mfd tunneb ära DNA-l peatunud RNA polümeraasi ja soodustab transkriptsiooni elongatsiooni või, juhul kui RNA polümeraas on peatunud vea tõttu DNA-l, osaleb transkriptsiooniga seotud reparatsioonis, suunates vigasele kohale NER raja valgud. Hoolimata Mfd DNA reparatsiooni soodustavast aktiivsusest on nähtud, et osades bakterites Mfd hoopiski soodustab mutatsioonide teket. Lisaks on meie töörühmas varasemalt nähtud ka NER-i osalust mutatsioonide tekitamises (Tark jt, 2008).

Minu töö eesmärgiks oli uurida kas ja kui suurt mõju avaldab testgeeni transkriptsioonitaseme suurendamine mutatsioonisagedusele selles geenis bakteri *P. putida* eksponentsiaalse faasi rakkudes ning kas mutatsioonisagedus on mõjutatud ka sellest, kas uuritava geeni replikatsioon ja transkriptsioon toimuvad samasuunaliselt või vastassuunaliselt. Kuna Mfd-l on erinevates bakterites nähtud erinevat mõju mutatsioonisagedusele, tahtsime ka teada kas ja kuidas Mfd puudumine mõjutab mutatsioonide teket *P. putida* rakkudes ning mis roll mutageensuses võiks olla Mfd-st sõltuval NER-il.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Söötmed, bakteritüved, plasmiidid

Täissöötmena kasutasime LB-söödet (Miller, 1972) ning minimaalsöötmena kasutasime M9 baasil valmistatud söödet (Adams, 1959). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le ka mikroelementide lahust (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdén, 1960), aminohapete hüdroolüsaati (CAA, lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ning süsinikuallikana kas glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit (15 g/l).

Bakteritüvede ja plasmiidide selektsiooniks kasutasime järgnevaid antibiootikume: ampitsilliini (Amp) (100 µg/ml), kanamütsiini (Km) (50 µg/ml), karbenitsilliini (Cb; 1-3 mg/ml), rifampitsiini (Rif; 100 µg/ml), tetratsükliini (Tet; *E. coli*-l 10 µg/ml; *P. putida*-l 50 µg/ml) ja K-telluriiti (Tel; *E. coli*-l 20 µg/ml; *P. putida*-l 40 µg/ml).

P. putida tüvesid kasvasime temperatuuril 30° C ja *E. coli* tüvesid temperatuuril 37° C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil (180 pööret/min).

Töös kasutatud bakteritüved ning plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi või plasmiid	genotüüp või iseloomustus	allikas
<i>Escherichia coli</i>		
CC118λpir	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD</i> $\Delta lacX74$ <i>galE galK</i> <i>phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am)	Herrero jt., 1990
DH5α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ (f80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3</i> (rB-mB-) <i>recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi	Bayley jt., 1977
lacIpheBA	PaW85 tüvi, mis sisaldab miniTn5 koosseisus <i>lacI-P_{lac}pheBA</i> testsüsteemi	Juurik jt., 2012

	(Tel ^f)	
lacIpheBAΔmfd	lacIpheBA tüvest Δmfd	käesolev töö
PaWΔmfd	PaW85 tüvest Δmfd	käesolev töö
PaWΔmfduvrA	PaWΔmfd tüvest <i>uvrA::tel</i>	käesolev töö
PaWΔmfduvrA2	PaWΔmfd tüvest <i>uvrA2::km</i>	käesolev töö
PaWΔmfduvrA2A	PaWΔmfduvrA2 tüvest <i>uvrA::tel</i>	käesolev töö
PaWΔmfduvrB	PaWΔmfd tüvest <i>uvrB::tel</i>	käesolev töö
Ptac-pheA+C	PaW85 tüvi, mis sisaldab kromosoomis transposooni miniTn5 koosseisus <i>lacI-P_{tac}-pheA+C</i> geenikasseti (Tel ^f)	käesolev töö
Ptac-pheA+CΔmfd	Ptac-pheA+C tüvest Δmfd (Tel ^f)	käesolev töö
Ptac-pheA+CΔmfduvrA	Ptac-pheA+CΔmfd tüvest <i>uvrA::tet</i>	käesolev töö
Ptac-pheA+CΔmfduvrA2	Ptac-pheA+CΔmfd tüvest <i>uvrA2::km</i>	käesolev töö
Ptac-pheA+CΔmfduvrA2A	Ptac-pheA+CΔmfduvrA2 tüvest <i>uvrA::tet</i>	käesolev töö
Ptac-pheA+CΔmfduvrB	Ptac-pheA+CΔmfd tüvest <i>uvrB::tet</i>	käesolev töö

Plasmiidid

mfdpJP	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloneeritud restriктаasidega BamHI ja EcoRI geeni <i>mfd</i> eelse ja järgse ala liitfragment TS1TS2 (Km ^r)	käesolev töö
pGP704uvrA::tet	pGP704L plasmiid, mis sisaldab tetratsükliini resistentsusgeeniga katkestatud <i>uvrA</i> geeni	Tark jt., 2008
pGP704uvrA2::km	pGP704L plasmiid, mis sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeniga katkestatud <i>uvrA2</i> geeni	Tark jt., 2008
pGP704uvrB::tet	pGP704L plasmiid, mis sisaldab tetratsükliini resistentsusgeeniga	Tark jt., 2008

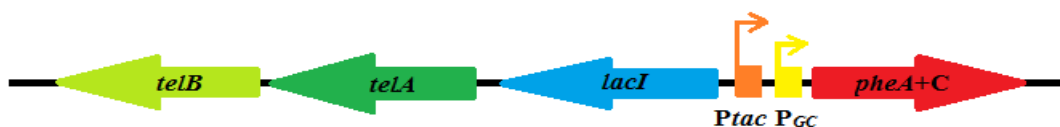
	katkestatud <i>uvrB</i> geeni	
pJP5603-I-SceI _{v2}	I-SceI restriksioonisaite ja multikloneerimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmid (Km ^r)	Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011
pKTpheA22TAG	aluste asendusmutatsioone detekteeriv plasmidne testsüsteem, kus plasmidis pKT240 sisalduva <i>pheA</i> geeni 22. koodon CTG (Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG (Cb ^r)	Tegova jt., 2004
pPUpheA+C	pPU1930 plasmidis on <i>pheA</i> geeni viidud positsiooni 221 üks lisa C nukleotiid (Amp ^r)	R. Tegova, avaldamata andmed
pRK2013	abiplasmid konjugatsioonil (Km ^r)	Figurski ja Helinski, 1979
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmid (Amp ^r , Cb ^r)	Wong ja Mekalanos 2000
pUC18NotlacI	plasmid pUC18NotKm ^r , kuhu on kloneeritud <i>lacI^q</i> repressor ja P _{tac} promootor plasmidist pBRlacItac	Juurik jt. 2012
pUC18NotlacIpheA+C	pPUpheA+C plasmidist Ecl136II ja PvuII-ga välja lõigatud P _{GC} - <i>pheA</i> +C geenikassett on sisestatud Ecl136II-ga avatud pUC18NotlacI plasmidi (Km ^r)	käesolev töö
pUTlacIpheA+C	plasmidist pUC18NotlacIpheA+C on kloneeritud <i>lacI</i> -P _{tac} - <i>pheA</i> +C geenikassett plasmidi pUTminiTn5Tel ^f	käesolev töö
pUTminiTn5Tel ^f	plasmid, mis sisaldab minitransposooni miniTn5Tel ^f (Amp ^r , Tel ^f)	Sanches-Romero jt., 1998

2.2.2 Raaminihkemutatsioone tuvastava testsüsteemi P_{tac}-*pheA*+C konstrueerimine ja viimine *P. putida* kromosoomi

LacI repressori inaktivatsioonil põhineva raaminihkemutatsioone tuvastava kromosomaalse testsüsteemi P_{tac}-*pheA*+C konstrueerimiseks lõikasime restriктаasidega PvuII ja Ecl136II plasmidist pPUpheA+C välja P_{GC} promootorit ja lisa C nukleotiidiga *pheA* geeni sisaldava fragmendi, P_{GC}-*pheA*+C. Järgnevalt inserteerisime P_{GC}-*pheA*+C geenikasseti

Ecl136II restriktasiga avatud P_{tac} promootorit ja *lacI* repressorgeeni sisaldavasse pUC18NotlacI plasmidi (Juurik jt. 2012), saadud plasmidi nimetasime pUC18NotlacIpheA+C. Geenikasseti olemasolu ja õiget orientatsiooni kontrollisime praimeritega prtac, pheAtsII, pheABamei, Rev ja pheAlõppvälja (tabel 2). Seejärel lõikasime plasmidist pUC18NotlacIpheA+C välja *lacI-P_{tac}-pheA+C* geenikasseti (joonis 9) restriktasiga NotI ning sisestasime sama ensüümiga lõigatud pUTminiTn5Tel^r olevasse transposooni miniTn5Tel^r koostisesse (Sanchez-Romero jt, 1998), saades plasmidi pUTlacIpheA+C. *lacI-P_{tac}-pheA+C* geenikasseti kontrolliks tegime PCR-i praimeritega prtac, pheAtsII ja pheABamei (tabel 2).

Testsüsteemi viisime *P. putida* tüve PaW85 kromosoomi, kasutades konjugatsiooni meetodit. Plasmid pUTminiTn5Tel^r ei ole võimeline *P. putida* rakkudes replitseeruma ja seetõttu said telluriiti sisaldaval minimaalsöötmel kasvada ainult transkonjugandid, kus minitransposoon oli inserteerunud bakteri genoomi. Moodustunud kolooniaid külvasime paralleelselt telluriiti ja karbenitsilliini sisaldavatele söötmetele. Karbenitsilliini tundlikele kolooniatele tegime PCR-i pheABamei ja pheAtsII praimeritega, et kontrollida testsüsteemi olemasolu.



Joonis 9. P_{tac} -*pheA+C* testsüsteemi graafiline joonis. 221. positsioonis lisa C nukleotiidiga *pheA* geen on viidud IPTG-ga indutseeritava P_{tac} promootori alla, millelt lähtuvat transkriptsiooni reguleerib negatiivselt LacI. Ilma IPTG-ta (isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid) toimub transkriptsioon konstitutiivselt promootorilt P_{GC} .

2.2.3 *mfd* geeni deletsiooniga *P. putida* tüvede konstrueerimine

mfd geeni deletsiooniga tüvede saamiseks kasutasime Podfai jt. (1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit. Meetodi etapid on kujutatud joonisel lisa 1.

Δmfd tüvede saamiseks amplifitseerisime esmalt PCR-iga geeni eelse (TS1-target sequence 1) ja järgse ala (TS2-target sequence 2), mõlemad umbes 650 aluspaari ulatuses.

Selleks kasutatavad praimerid olid PpmfdTS1F ja PpmfdTS1R ning PpmfdTS2F ja PpmfdTS2R (tabel 2). PpmfdTS1R praimer sisaldas 5' otsas PpmfdTS2F praimeriga komplementaarset järjestust, et järgnevas etapis oleks võimalik TS1 ja TS2 fragmendid kokku liita. Edasi tegime praimeritega PpmfdTS1F ja PpmfdTS2R „Sewing“ PCR-i, mille jooksul toimus TS1 ja TS2 fragmentide kokkuliitmine, saades TS1TS2 fragmendi. TS1TS2 fragmendi kloneerisime plasmidi pJP5603-I-SceI_{v2} (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011), kasutades plasmidi ja fragmendi lõikamiseks firma „Fermentas“ restriktase FastDigestBamHI ja FastDigestEcoRI, ning saadud plasmidi nimetasime mfdpJP. Selle plasmidi selekteerisime *E. coli* tüves CC118λpir kanamütsiini sisaldaval söötmel. Järgnevalt amplifitseerisime TS1TS2 fragmenti PCR-iga, kasutades primereid Fw ja Rev (tabel 2) ning sekveneerisime selle kasutades praimerit Fw, et kontrollida, ega TS1TS2 fragmenti ei ole PCR-i käigus tekkinud mutatsioone. Seejärel viisime korrektset DNA järjestust sisaldava plasmidi konjugatsiooni teel bakterisse *P. putida*, kus see plasmid ei replitseeru ning inserteerub selles sisalduva TS1TS2 järjestuse ja kromosoomi vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni kaudu bakteri kromosoomi. Moodustunud kointegraadiga rakke selekteerisime kanamütsiini sisaldaval söötmel, millel olid võimalised kasvama ainult kointegraati sisaldavad rakud. Kointegraadi olemasolu kontrollisime praimeritega PpmfdTS1F ja PpmfdTS2R. Järgnevalt viisime elektroporatsiooni abil rakkudesse I-SceI nukleaasi ekspresseeriva plasmidi pSW(I-SceI) (Wong ja Mekalanos, 2000), kasutades selektsiooniks kanamütsiini ja karbenitsilliini sisaldavat LB-söödet. Selleks, et indutseerida plasmidi pSW(I-SceI) poolt tekitatavaid lõikeid I-SceI restriksioonisahtides kromosoomi integreerunud mfdpJP plasmidis, kasvasime rakke üleöö 30° C loksutil 5 ml LB-vedelsöötmes, millele lisasime karbenitsilliini (3 mg/ml). Katkete tekkimise tagajärjel toimub homoloogiline rekombinatsioon TS1TS2 fragmendi ja kromosoomis olevate *mfd* eelse TS1 või *mfd* järgse TS2 ala vahel. Pooltel juhtudel deleteerub *mfd* geen koos vektoriga ning rakk ei ole enam võimeline kanamütsiinil kasvama. Et isoleerida need kloonid, kus kromosoomist on deleteerunud algne *mfd* geen, tõmbasime 5 µl üleöö kasvanud kultuuri karbenitsilliiniga LB-tassil üksikkolooniateks. Geeni deleteerumist kontrollisime kolooniate paralleelkylviga LB-tassidele, mis sisaldasid selektsiooniks kas kanamütsiini või karbenitsilliini. Kanamütsiini suhtes tundlikes kolooniates kontrollisime *mfd* geeni deleteerumist PCR-iga, kasutades primereid PpmfdTS2R ja Ppmfdkesk (tabel 2). pSW(I-SceI) plasmidist vabanemiseks kasvasime baktereid ilma antibiootikumita 5 ml LB-vedelsöötmes ning tõmbasime 5 µl üleöö kultuuri LB-tassil üksikkolooniateks. pSW(I-SceI) kadu kontrollisime kolooniate paralleelkylviga LB- ja karbenitsilliiniga LB-tassidele. Karbenitsilliini tundlikke kolooniaid kontrollisime ka PCR-iga, kasutades primereid pSW-F ja pSW-R (tabel 2), mis peaksid andma produkti plasmidi olemasolul.

2.2.4 NER valkude suhtes defektsete tüvede konstrueerimine

UvrA, UvrA2 ja UvrB suhtes defektsete *P. putida* tüvede konstrueerimiseks asendasime homoloogilise rekombinatsiooni teel tüvedes Ptac-pheA+C ja PaWmfd funktsionaalse geeni katkestatud geeniga. Selleks viisime antud tüvede kromosoomi konjugatsiooni meetodil plasmiidid pGP704uvrA::tet, pGP704uvrA2::km ja pGP704uvrB::tet (Tark jt. 2008), mis ei ole võimelised *P. putida* tüvedes replitseeruma. Transkonjugantide õigsust kontrollisime karbenitsilliini resistentsuse suhtes- ainult need kolooniad, mis ei kasvanud karbenitsilliini juuresolekul kontsentratsioonil 3 mg/ml, lugesime tõelisteks rekombinantideks. *uvrA* geeni katkestust tüvedes Ptac-pheA+CΔmfduvrA ja PaWmfduvrA kontrollisime, võrreldes konstrueeritud tüvede ning Ptac-pheA+C ja PaWmfd tüvede UV kiirguse taluvust Milleri meetodil (Miller, 1992). *uvrA2* geeni katkestust tüvedes Ptac-pheA+CΔmfduvrA2 ja PaWmfduvrA2 kontrollisime PCR-iga, kasutades praimereid KmOc ning *uvrA2* lõpp (tabel 2). *uvrB* geeni katkestust tüvedes Ptac-pheA+CΔmfduvrB ja PaWmfduvrB kontrollisime PCR-iga, kasutades praimereid UvrBylem ja *uvrB* Acc65EcoR1251alt (tabel 2).

uvrA ja *uvrA2* geenide suhtes topelt defektsete tüvede konstrueerimiseks viisime juba *uvrA2* geeni katkestusega tüvedesse Ptac-pheA+CΔmfduvrA2 ja PaWmfduvrA2 konjugatsiooni teel plasmidi pGP704uvrA::tet. Transkonjugante selekteerisime kanamütsiini ja tetratsükliiniga LB-söötmel ja kontrollisime karbenitsilliini resistentsuse suhtes ning Milleri meetodil (Miller, 1992).

2.2.5 Plasmiidse DNA eraldamine „Axygen“ kitiga ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks „Axygen AxyPrep™ Plasmid Miniprep“ kitiga kasvasime plasmidi sisaldavaid *E. coli* rakke üleöö 5 ml LB-söötmes plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi juuresolekul, aereerides rakke loksutil 180 pööret/minutis. Järgnevalt tsentrifuugisime rakud tuubi põhja 30 sekundi vältel ja suspendeerisime neid 250 µl S1 puhvris (Rnaas A-d sisaldav lahus). Rakkude lüüsimiseks lisasime suspensioonile 250 µl S2 puhvrit (lüsotsüümi lahus), segasime ning hoidsime 5 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt lisasime 350 µl S3 puhvrit (neutraliseeriv lahus), segasime ning tsentrifuugisime lüüsunud rakkude kestad ja kromosoom-valkkompleksi 10 minuti jooksul põhja. Edasi pipeteerisime supernatandi kolonni ja tsentrifuugisime 1 minuti. Selle aja jooksul toimus DNA seondumine kolonni maatriksile. Soolade eraldamiseks pipeteerisime kolonni kahel korral 700 µl pesupuhvrit W2 ning tsentrifuugisime 1 minuti. Seejärel elueerisime DNA 60 µl elueerimispuhvriga.

Kõik tsentrifuugimised viisime läbi maksimumpöõretel (13400 pöõret/min), kasutades firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugi „Mini Spin“.

DNA restriksiooniks kasutasime firma „Fermentas“ ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid ette nähtud vastavaid ensüüme tootva firma poolt koostatud ensüümide kataloogis.

2.2.6 Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks algse ja katkestatud geeni vahel (NER valkude suhtes defektsed tüved), geenide deleteerimiseks (Δmfd) ning Ptac-*pheA*+C testsüsteemi viimiseks *P. putida* rakkudesse kasutasime bakterite konjugatsiooni. Selleks kasvasime üleöö LB-vedelsöötmes, millele oli lisatud plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi, *E. coli* tüve CC118 λ pir, mis sisaldas vajaliku katkestuskonstruktiga plasmidi või ülekantavat plasmidi, retsipienttüve ning helperplasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Edasi lahjendasime üleöö kasvanud kultuurid tiheduseni $A_{580} = 0,1$ värskesse ilma antibiootikumita LB-vedelsöötmesse ja kasvasime eksponentsiaalse kasvufaasi tiheduseni $A_{580} = 0,6-0,8$. Seejärel segasime igast tüvest (doonor, helper, retsipient) 100 μ l kokku ning kandsime segu LB-tardsöötmele. Konjugatsioon toimus üleöö temperatuuril 30° C. Edasi suspendeerisime rakukultuuri 1 ml 1 x M9 lahuses ning plaatisime sellest 100 μ l selektiivsöötmele, millel said kasvada ainult transkonjugandid.

2.2.7 Bakterite elektroporatsioon

E. coli rakkude elektroporatsiooniks kasutasime muudatustega Sharma ja Schimke (1996) meetodit. *E. coli* tüvesid DH5 α ja CC118 λ pir kasvasime üleöö LB-vedelsöötmes. Kompetentide saamiseks lahjendasime üleöö kultuure värskesse LB-vedelsöötmesse optilise tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ning kasvasime loksutil (180 pöõret/minutis) 1,5-2 tundi, kuni bakterikultuur jõudis optilise tiheduseni $A_{580} = 1-1,5$. Järgnevalt tsentrifuugisime rakud söötimest põhja 13400 x g 30 sekundi vältel firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja eemaldasime supernatandi. Seejärel pesime *E. coli* rakke kolm korda 10%-se jääkülma glütserooliga ja suspendeerisime rakud 50 μ l 10% glütseroolis üles.

P. putida puhul kasutasime elektroporatsiooniks Choi jt. (2006) meetodit. Selleks kasvasime *P. putida* rakke LB-vedelsöötmes ning kompetentide tegemiseks tsentrifuugisime 1 ml üleöö kultuurist rakud 30 sekundi jooksul kokku. Seejärel eemaldasime supernatandi ja pesime rakke kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeerisime üles 50 μ l-s 100 mM sahharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks lisasime *E. coli* või *P. putida* rakkudele ligikaudu 100 ng plasmiidset DNA-d ning pipeteerisime rakud jääl jahutatud elektroporatsiooni küveti. Elektroporatsiooni teostasime firma „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 1,5 ml LB-vedelsöödet ning kasvasime ligikaudu tund aega loksutil, *E. coli* rakke temperatuuril 37° C ning *P. putida* rakke temperatuuril 30C°. Seejärel tsentrifuugisime rakud põhja, suspendeerisime ligikaudu 100 µl LB-söötmes ning plaatisime selektiivtassile.

2.2.8 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

PCR reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsiooni segu sisaldas 1 x PCR-i puhvrit (10 kordse puhvri koostis oli: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Triton X 100; 0,5% Ficoll 40; 1 mM tartrasiin); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d; 0,5 ühikut professor Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi ja praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 2. PCR-i segule lisasime bakterirakke või ligikaudu 10 ng eraldatud DNA-d.

PCR-i teostasime firmade „Biometra“ ja „Fermentas“ PCR-i masinatega järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96° C 30 sekundid kuni 1 minut, praimerite seondumine temperatuuril 56-63° C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72° C 30 sekundit kuni 1,5 minutit. Tingimused varieerusid sõltuvalt amplifitseeritava DNA pikkusest ja praimerite oligonukleotiidsest koostisest. Reaktsioon toimus kokku 25 tsükli.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
Fw	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	seondub plasmidi pUC18Not <i>lacZ</i> geenile (positsioonides 379 kuni 395) ja pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiidile, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
KmOc	5'-TCGAGCAAGACGTTTCCC-3'	komplementaarne <i>km</i> geeniga positsioonides 17 kuni 34, suunaga geeni algusest välja
Ppmfdkesk	5'-CAGAGGACTACCTGCCTGAC-3'	komplementaarne <i>mfd</i> geeni alaga positsioonides 3044 kuni 3053, suunaga geenist

		eemale
PpmfdTS1F	5'- ATATGAATTCCGGTCTTCTCGATCA GGATG-3'	sisaldab 5' otsas EcoRI lõikesaiti ja on komplementaarne <i>mfd</i> geeni eelse alaga positsioonides - 646 kuni -627, suunaga geeni poole
PpmfdTS1R	5'- CGCATGAGTCTTCCTTAGGCGATTG CACTCCAAGCGTTGC-3'	komplementaarne <i>mfd</i> geeni eelse alaga positsioonides -5 kuni -24 ja sisaldab PpmfdTS2F praimeriga komplementaarset osa, suunaga geenist eemale
PpmfdTS2F	5'-GCCTAAGGAAGACTCATGCG-3'	komplementaarne <i>mfd</i> geeni järgse alaga positsioonides 3645 kuni 3664 initsiaatorkoodonist, suunaga geenist eemale
PpmfdTS2R	5'- ATATGGATCCCAGTTCGGATAGGCG TTCAC-3'	sisaldab 5' otsas BamHI lõikesaiti ja on komplementaarne <i>mfd</i> geeni järgse alaga positsioonides 4060 kuni 4080 initsiaatorkoodonist, suunaga geeni poole
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
Rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	seondub plasmidi pUC18Not <i>lacZ</i> geeni algusesse (positsioonides 461 kuni 476) ja pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiidile, suunaga

		multikloneerimisjärjestuse poole
uvrA2lõpp	5'-CAAGGCCTTTGCCAAAAACG-3'	komplementaarne <i>uvrA2</i> geeni alaga positsioonides 2494-2514 nukleotiidi allavoolu translatsiooni startkoodonist ATG
uvrB_Acc65EcoRI251alt	5'-TTGAATTCGGTACCTTAGGTCACGTAGTGGCTCTT-3'	komplementaarne <i>uvrB</i> geeni alaga positsioonides 733 kuni 750, suunaga geeni alguse poole
UvrBylemine	5'-ATGTCCGAGTTCCAG-3'	komplementaarne <i>uvrB</i> geeni alaga positsioonides 1 kuni 15, suunaga geeni sisse
prtac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	seondub promootorile P _{tac}
pheAtsII	5'-GTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295-313 nukleotiidi allavoolu translatsiooni startkoodonist ATG
pheAlõppvälja	5'-TCTTCGCATTTAAGGGTGTAG-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni järjestusega positsioonides 1813 kuni 1833 initsiaatorkoodonist ATG
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni poole
ARBtel1	5'-GGGTGCAGAGCCATAAGC-3'	komplementaarne <i>telB</i> geeni stardikoodonist ATG allavoolu jääva alaga positsioonides 938-955, suunaga geenist eemale
ARBtel2	5'-GGCAAGAGACGAAAGCCC-3'	komplementaarne <i>telB</i> geeni stardikoodonist ATG allavoolu jääva alaga positsioonides 956-973,

		suunaga geenist eemale
ARB6	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNA CGCC-3'	kõdupraimer, mille linkerregioonil ACGCC on <i>P. putida</i> kromosoomis 12050 kordust
ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	seondub kõdupraimeri ARB6 konserveerunud 5' otsaga

2.2.9 Geelelektroforees

Geelelektroforeesi kasutasime PCR produktide, eraldatud plasmiidse DNA ning DNA fragmentide pikkuse hindamiseks. Selleks lisasime plasmiidsele DNA-le või DNA fragmendile 0,04% broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl DNA kohta 4µl värvi. Proovid kandsime horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,4 µg/ml. DNA fragmentide pikkuste määramiseks kasutasime firma „Fermentas“ markereid „ZipRuler Express DNA Ladder 1“ või „ZipRuler Express DNA Ladder 2“. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 10-15 V/cm. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

2.2.10 ARB-PCR ja DNA sekveneerimine

Selleks, et kindlaks teha *P. putida* genoomi inserteerunud minitransposooni miniTnTel^r koosseisus oleva *lacI-P_{tac}-pheA+C* geenikasseti asukoht, amplifitseerisime PCR abil kromosoomist piirkonna, mis sisaldas minitransposooni ja sellega külgneva ala DNA liitjärjestust, ning sekveneerisime produkti kasutades ARB-PCR-i.

ARB-PCR koosneb kahest etapist. Esimeses etapis tekivad juhusliku pikkusega fragmendid, kasutades praimerit, mis kinnitub meie fragmendile, ja praimerit, mis kinnitub juhuslikku kohta genoomil. Meie kasutasime esimeses etapis praimerit ARBtel1 ja kõdupraimerit ARB6 (tabel 2), kontsentratsioonidega 10 pmol reaktsiooni kohta. Kõdupraimeri 3' otsas asub 5-6 nukleotiidi pikkune linkerregioon, mis on valitud *P. putida* kromosoomiga seondumise sageduse alusel ja on kõikidel kõdupraimeritel erinev. Järgneb 10 nukleotiidi pikkune regioon, mis sisaldab kõiki nelja nukleotiidi juhuslikus järjekorras ning 5'-ots on konserveerunud ja sisaldab järjestust, millega teises etapis seondub ARB2 praimer (tabel 2). ARB-PCR esimene etapp toimus järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96° C 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 30° C 30 sekundit, DNA süntees

temperatuuril 72° C 1,5 minutit, kokku 6 tsükli. Sellele järgnes 30 tsükli, kus DNA denaturatsioon toimus temperatuuril 96° C 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 45° C 30 sekundit ja DNA süntees temperatuuril 72° C 2 minutit.

Teises etapis seondub kasutatav praimerite paar esimese paari poolt moodustunud PCR produktidele. Tõenäosus, et esimeses etapis moodustub vale genoomi ala produkte, millele mõlemad teise etapi praimerid kinnituvad, on väga väike. Meie võtsime teise ARB-PCR etappi 0,5 µl esimese etapi produkti ja kasutades praimerit ARBtel2 ja kõdupraimerit ARB2 (tabel 2) amplifitseerisime esimese etapi produkte. Teise etapi reaktsioon toimus tingimustes: DNA denaturatsioon temperatuuril 96° C 30 sekundit, praimerite seondumine 54° C 30 sekundit ja DNA süntees temperatuuril 72° C 2 minutit, kokku 30 tsükli.

Enne sekveneerimiseks ettevalmistavat reaktsiooni eemaldasime reaktsioonisegust kasutamata jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks töötlesime produkte aluselise fosfataasi (SAP; 1 U/µl) ja eksonukleas I-ga (ExoI; 2,5 U/µl), reaktsiooni segu maht oli 10 µl-i. Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37° C ning ensüümid inaktiveeriti 15 minuti jooksul temperatuuril 80° C.

Sekveneerimiseks valmistasime proovid ette kitiga „Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ firmalt „Applied Biosystems“. Reaktsiooni võtsime 1 µl eelnevalt kirjeldatud töötamise produkti ning praimerina kasutasime ARB2-te (1,6 pmol).

DNA järjestused määrati firma „Applied Biosystems“ 3730xl kapillaarsekvenaatoriga.

2.2.11 *lacI-P_{tac}-pheA+C* ja *lacI-P_{tac}-pheBA* geenikassetiga *P. putida* rakkudes toimuvate mutatsioonide tekkesageduse määramine

lacI-P_{tac}-pheA+C ja *lacI-P_{tac}-pheBA* geenikassetiga kromosomaalset testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* rakke kasvasime 1 ml glükoosi sisaldavas minimaalsöötmes 4-6 tundi. Seejärel tegime rakukultuurist 10⁵ kordse lahjenduse ja kasvasime rakke 20-24 tundi 30° C loksutil 2,3 ml minimaalsöötmes kas ilma või 1 mM IPTG juuresolekul. Järgnevalt plaatisime ligikaudu 1 x 10⁷ testsüsteemi sisaldavat rakku koos 1 x 10⁹ taustrakuga, milleks olid kromosomaalse testsüsteemita PaW85 rakud (vajalik selleks, et tagada kõikides katsetes sama rakkude arv), fenooli ainsa süsiniku allikana sisaldavatele minimaaltassidele ja fenooli minimaaltassidele, mis sisaldasid ka 0,5 mM IPTG-d. *lacI-P_{tac}-pheA+C* geenikassetiga Phe⁺ reverantide akumulereerumist fenooli selektiivtassidel jälgisime kasvavas populatsioonis 8 päeval (antud testsüsteemi puhul võtab Phe⁺ kolooniate ilmumine fenooli sisaldavale minimaalsöötmele aega 8 päeva) ning 0,5 mM IPTG-ga fenooli tassidel 3 päeval (IPTG

võimaldab *pheA* geeni transkriptsiooni tugevalt P_{tac} promootorilt ja seega kolooniate märksa kiiremat kasvu fenooli sisaldaval minimaalsöötmel). *lacI-P_{tac}-pheBA* Phe^+ mutantide akumul eerumist jälgisime fenooli tassidel 3-10 päevade jooksul. Phe^+ mutantide tekkesageduse arvutasime tassil olevate testsüsteemi sisaldavate elusrakkude kohta.

2.2.12 *P. putida* rakkudes toimuvate mutatsioonide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga

Mutatsioonide tekkesageduse määramiseks plasmiidis kasutasime aluste asendusmutatsiooni tuvastavat TAG testsüsteemi. Selles testsüsteemis on plasmidi pKT204 viidud fenooli monooksügenaasi geen *pheA*, milles on 22. koodon (Leu) asendatud stopkoodoni TAG-ga ning geeni transkriptsioon on indutseeritud konstitutiivselt avalduva promootori poolt.

Selleks, et mutatsioonide tekkesagedust määrata, viisime mutantset *pheA* geeni sisaldava pKTp*heA*22TAG plasmidi uuritavasse tüvesse. Testsüsteemi sisaldavaid rakke kasvasime sarnaselt *lacI-P_{tac}-pheA+C* ja *lacI-P_{tac}-pheBA* meetodikale, kuid lisasime glükoosi sisaldavale minimaalsöötmele karbenitsilliini (1,5 mg/ml). 0,5 ml üleöö kultuuri tsentrifuugisime kokku, eemaldasime söötme, võtsime rakud 100 µl 1 x M9-s üles ja plaatisime karbenitsilliini (1,5 mg/ml) sisaldavatele fenooli minimaaltassidele. Phe^+ mutantide teket jälgisime 2-10 päeval. Phe^+ reverantide tekkesageduse arvutasime tassil olevate elusrakkude kohta.

2.2.13 *P. putida* Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Selleks, et määrata mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* kromosoomis väljaspool meie testsüsteeme, määrasime Rif resistentsete mutantide tekkesageduse. Kasvatamistingimused olid sarnased eelpool kirjeldatule. 20-24 tundi kasvanud sõltumatutest kultuuridest plaatisime 0,5 ml kultuuri rifampitsiini sisaldavale LB-tassile ja inkubeerisime temperatuuril 30° C. Tekkinud kolooniaid loendasime 1 ja 2 päeval. Üleöö kasvanud vedelkultuurides olevate elusrakkude arvu (CFU) määramiseks tegime lahjendused kultuuridest 1 x M9-sse ja kandsime need LB-tassile. Lähtudes LB tassidele tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjendustest, arvutasime rakkude hulga (CFU) 1 ml üleöö kasvanud kultuuri kohta. Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määrasime 1 ml üleöö kultuuris olnud elusrakkude kohta ja arvutasime ümber 1×10^9 raku kohta.

2.2.14 *P. putida* populatsiooni elumuse määramine fenooli-minimaalsöötmelt

Bakterirakkude elumuse määrasime kolooniaid moodustavate rakkude (CFU - *Colony Forming Units*) arvukuse alusel samadelt fenooli minimaaltassidelt, millel jälgisime Phe⁺ reverantide teket. Vältides Phe⁺ kolooniaid, lõikasime steriilset 1 ml pipetiotsikut kasutades tassidelt agaritükikese, panime selle 1 x M9 sisaldavasse ependorfi ning loksutasime 20 minutit 30° C termostaadis. Järgnevalt tegime lahjendused ning kandsime need LB-tassidele, mis sisaldasid rakkude selektsiooniks vajalikku antibiootikumi. Lähtudes tassile tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjendustest arvutasime agaritükil olevate elusrakkude arvu. Saadud arvust tuletasime tassi pindala ja agaritüki pindala suhte alusel kogu elusrakkude arvu fenooli minimaaltassil.

2.2.15 Rakulüsaatide valmistamine valkude eraldamiseks

Rakulüsaadi valmistamiseks eksponentsiaalse faasi rakkudest kasvasime *lacI-P_{tac}-pheA*+C geenikassetiga kromosomaalset testsüsteemi sisaldavaid Phe⁺ *P. putida* rakke üleöö 5 ml LB-vedelsöötmes. Edasi lahjendasime 3 ml üleöö kultuuri 100 ml LB-vedelsöötmesse ning LB-vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud 1 mM IPTG ja kasvasime rakke umbes 2 tundi optilise tiheduseni A₅₈₀= 0,9. Järgnevalt tsentrifuugisime rakud söötimest või 1 x M9-st põhja 2500 x g 5 minuti jooksul temperatuuril 4° C firma „Hettich“ Universal 320R tsentrifuugiga. Pärast söötme eemaldamist pesime rakke 1 ml fosfaatpuhvriga (100 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,5), resuspendeerisime rakud 0,5 ml jääkülmas fosfaatpuhvris ja hoidsime neid jääl. Rakud lõhkusime sonikeerimisega jääl 3 x 10 sekundit, kasutades „Cole-Parmer 4710 Series Ultrasonic Homogenizer“-it. Seejärel tsentrifuugisime lüsaate rakukestade ja membraanide sadestamiseks 30 minutit 16000 x g, temperatuuril 4° C. Valke sisaldava supernatandi tõstsime uude tuubi ning säilitasime temperatuuril -20° C.

2.2.16 Valkude kontsentratsiooni määramine

Valkude kontsentratsiooni määrasime trüptofaani fluorestsentsi järgi. Selleks pipeteerisime mitmes korduses 200 µl-sse 8 M urea/100 mM TRIS-HCl pH 7,5 1 µl, 3 µl ja 6 µl trüptofaani lahust (kontsentratsioonidega 0,01 µg/µl, 0,1 µg/µl ja 1 µg/µl) ning samas koguses meie rakkude lüsaati. Järgnevalt mõõtsime optilise tiheduse ergutuslainepikkusel 295(5) nm ja emissiooni lainepikkusel 350(20) nm. Trüptofaani tasemete järgi tegime kalibratsiooni kõvera ning selle järgi arvutasime rakulüsaadis oleva valgu koguse, arvestusega, et 1 µg trüptofaani vastab 91 µg *E. coli* raku lüsaadile.

2.2.17 Western blot analüüs

Selleks, et määrata fenooli monooksügenaasi hulka rakulüsaatidest, kasutasime *Western blot* meetodit (Burnette, 1981). Valgud lahutasime 10% SDS-PAAG geelis (Schägger, 2006). Enne geelile kandmist lisasime lüsaatidele Laemmli puhvrit (Laemmli, 1970) ja kuumutasime proove 4 minutit temperatuuril 100° C. Geelile kandsime 50 µg totaalkalku. Geel-elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 10 V/cm 1 tunni jooksul. Valkude ülekandmiseks destilleeritud veega immutatud ja Westerni ülekandepuhvris (48 mM Tris pH 8,3, 39 mM glütsiin, 0,037 % SDS, 20% metanool) hoitud nitrotselluloos membraanile (GE Healthcare Amersham™) kasutasime „Bio-Rad Trans-blot® SD“ masinat. Valke kanti üle 25 minutit voolutugevusel 3 mA/cm² ülekandepuhvris.

Mittespetsiifilise signaali blokeerimiseks inkubeerisime membraani 30 minutit 10 ml blokeerimislahuses (1 × TBS, 2% lõssi, 0,05% Tween 20, dH₂O). Järgnevalt inkubeerisime membraani 30 minutit blokeerimislahuses, kuhu lisasime 1: 333 primaarset antikeha, milleks oli polükloonaalne PheA vastane hiire antikeha IgG (LabAS Ltd., Tartu). Seejärel pesime membraani 4 × 5 minutit 10 ml pesulahusega (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, dH₂O) ning inkubeerisime 30 minutit blokeerimislahuses, kuhu lisasime 1: 5000 sekundaarset antikeha - IgG peroksüdaasiga konjugeeritud antikehad (LabAS Ltd., Tartu). Järgnes membraani pesu 4 × 5 minutit pesulahusega ja ilmutamine ilmutuslahusega (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mg/ml NBT, 50 mg/ml BCIP, dH₂O) umbes 2 tundi. Ilmutamisreaktsiooni peatasime stopplahusega (1 x TBS, 20 mM EDTA, dH₂O).

2.2.18 DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test

Bakterite tundlikkuse testimiseks erinevate DNA-d kahjustavate kemikaalide mitomütsiin C (MMC), metüülmetaansulfonaadi (MMS), nitrokinoliini (NQO) ja paraquaat dikloriid x-hüdraadi suhtes kasvasime uuritavaid *P. putida* tüvesid üleöö 1,5 ml LB-söötmes. Järgnevalt tegime kultuuridest 10⁻²-10⁻⁷ lahjendusterea 1 x M9 lahusesse ning kandsime 10 µl igat lahjendust kemikaali sisaldavale LB-tassile. Nende kemikaalide mõju hindamiseks eksponentsiaalse faasi rakkudele lahjendasime üleöö kasvanud vedelkultuurid värskesse 1,5 ml LB-vedelsöötmesse ja kasvasime eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid rakke tiheduseni A₅₈₀= 0,6-0,8. Seejärel tegime lahjendused 1 x M9 lahusesse ja kandsime lahjendusteread kemikaaliga LB-tassile. Kontrolliks kandsime lahjendused ka ilma kemikaalita LB-tassile. Bakterite kasvu kemikaale sisaldavatel söötmetel hindasime päeva või kahe pärast, sõltuvalt kemikaalist.

2.2.19 Rekonstruktsiooni katse

Selleks, et selgitada välja, mitu päeva võtab aega Phe⁺ mutantide kolooniate nähtavale tulek selektiivsöötmetel läbi taustarakkude kihi, võtsime külvinõelaga Phe⁺ rakkude massi ning segasime rakud ära 100 µl-is 1 x M9-s. Järgnevalt tegime lahjenduste rea ning plaatisime umbes 100-200 Phe⁺ rakku koos 1 x 10⁹ taustrakkudega (PaW85) fenooli sisaldavale minimaaltassile. Jälgisime kolooniate ilnumist tassile.

2.2.20 Mutatsioonisageduste võrdlus kasutades ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja Tukey testi

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks mutatsioonisageduste vahel kasutasime statistikapaketti STATISTICA 10. Kuna meie andmed ei olnud normaaljaotuses, siis nende normaaljaotusesse viimiseks võtsime andmetest kümnendlogaritmi, liites enne kõikidele andmetele juurde 1, et vältida logaritmi võtmist 0-st. Tüvede mutatsioonisageduste tulemusi analüüsisime multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. *P*-väärtused leidsime logaritmitud andmetele Tukey HSD testiga programmis Post-hoc.

2.3 Tulemused

2.3.1 Transkriptsiooni mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri *P. putida* kromosoomis, kasutades raaminihkemutatsioone detekteerivat testsüsteemi

Selleks, et uurida, kuidas mõjutab mutatsioonisagedust mutatsiooni märklaudgeeni transkriptsioonitase, konstrueerisime testsüsteemi, mille puhul on võimalik rakkudes kunstlikult suurendada märklaudgeeni transkriptsioonitaset (joonis 9). Testsüsteemi konstrueerimisest on täpsemalt juttu töö osas „Materjal ja metoodika“, peatükis 2.2.2. Antud testsüsteemis on fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* järjestusse, mis sisaldab kuut tsütosiin-nukleotiidi (C), viidud juurde veel üks lisa tsütosiin ja geeni lugemisraam on rikutud. Selleks, et sünteesida funktsionaalne valk, peab toimuma muteeritud saidist ühe C-nukleotiidi deletsioon, et taastuks lugemisraam. C-nukleotiidi sisaldav *pheA* alleel (*pheA*+C konstrukt) on viidud konstitutiivselt avalduva mõõduka tugevusega promootori P_{GC} kontrolli alla. Lisaks on *pheA* geen viidud ka repressori LacI ja IPTG-ga indutseeritava promootori P_{tac} kontrolli alla. Kuna P_{tac} on *lac* ja *trp* promootorite hübriid, sisaldades *lac* promootori -10 regiooni ja *trp* promootori -35 regiooni, on P_{tac} tugev ja hästi kontrollitav promootor. Kui keskkonnast puudub IPTG, seondub repressor LacI *lac* promootorile, inhibeerides transkriptsiooni P_{tac} -ilt. IPTG lisamisel seondub see LacI-ga, muutes valgu konformatsiooni, mille tulemusena ei ole LacI enam võimeline *lac* promootorile seonduma ja transkriptsioon toimub tugevalt P_{tac} promootorilt. Selleks, et *pheA*+C konstrukt *P. putida* kromosoomi viia, sisestasime selle miniTn5Tel^r transposooni, mis inserteerub juhuslikku kohta bakteri kromosoomis.

Kuna meie üheks eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad mutatsioonisagedust bakteris *P. putida* transkriptsiooni ja replikatsiooni samasuunaline ning vastassuunaline kokkupõrge, valisime P_{tac} -*pheA*+C testsüsteemiga tüvede hulgast 2 tüve, milles toimus *pheA* geeni replikatsioon vastassuunas transkriptsiooniga, ja 2 tüve, milles toimus *pheA* geeni replikatsioon samas suunas transkriptsiooniga. Testsüsteemi inserteerumise koht ja kokkupõrke suund on toodud tabelis 3.

Tabel 3. P_{tac} -*pheA*+C testsüsteemi asukohad *P. putida* kromosoomis ning *pheA* geeni transkriptsiooni ja replikatsiooni suund.

Tüvi	Lookus	Valgu funktsioon	Transkriptsiooni ja replikatsiooni suund
Ptac- <i>pheA</i> +C_2	PP1517	Akriflaviini resistentsuse valk	samasuunaline

Ptac-pheA+C_3	PP2094	Nitraati siduv valk NasS	vastassuunaline
Ptac-pheA+C_4	PP4517	Konserveerunud hüpoteetiline valk	vastassuunaline
Ptac-pheA+C_13	PP3007	Konserveerunud hüpoteetiline valk	samasuunaline

Selleks, et välistada võimalus, et meie testsüsteem on inserteerunud kromosoomis mõnda geeni, mis mõjutab mutatsioonisagedust, võrdlesime nende tüvede Rif resistentsete kolooniate tekkesagedust („Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.13). Rif takistab RNA sünteesi elongatsiooni esimesi etappe, seondudes RNA polümeraasi β -subühikuga RpoB ning resistentsuse tekkeks peab toimuma mutatsioon *rpoB* geenis, mille tulemusena ei ole Rif enam võimeline RpoB-ga seonduma. Rif mutatsioonisagedus peegeldab ka raku üldist mutatsioonisagedust. Seega kui testsüsteem on sattunud geeni, mis põhjustab mutatsioonisageduse tõusu, peaks see peegelduma ka Rif resistentsete mutantide tekkesageduses. Rif resistentsete mutantide tekkesagedus uuritavades *P_{tac}-pheA+C* testsüsteemiga tüvedes osutus sarnaseks metsiktüvega (testsüsteemita *P. putida* PaW85), me ei täheldanud statistiliselt olulisi erinevusi (andmeid ei ole esitatud).

IPTG mõju uurimiseks fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* avaldumisele teostasime *Western blot* analüüsi („Materjal ja meetodika“, peatükid 2.2.15-2.2.17). Selleks kasvasime tüvest Ptac-pheA+C_2 saadud Phe⁺ mutandi rakud ja *P. putida* algse tüve PaW85 rakud eksponentsiaalsesse faasi IPTG juuresolekul või ilma ning valmistasime rakudest lüsaadid. 10% SDS-PAAG geelil lahutasime 50 µg totaalkalku ning kandsime valgud geelilt üle nitrotselluloosfiltrile, mida hiljem töötlesime antikehadega, milleks olid PheA vastased polükloonaalsed antikehad. Pilt eksponentsiaalse faasi *Western blot*-ist on joonisel 10. Jooniselt on näha, et IPTG-ga kasvanud kultuuril on fenooli monooksügenaasi kogus oluliselt suurem kui ilma IPTG-ta kasvatatud rakkudel. Kõikidel proovidel on lisaks fenooli monooksügenaasile reageerinud antikehaga veel üks valk. Kuna meie kasutatud *pheA* vastane antikeha oli polükloonaalne, siis võis see lisaks PheA-le ära tunda ka mõnda muud valku, mis on indutseeritud bakteri *P. putida* eksponentsiaalse faasi rakkudes.



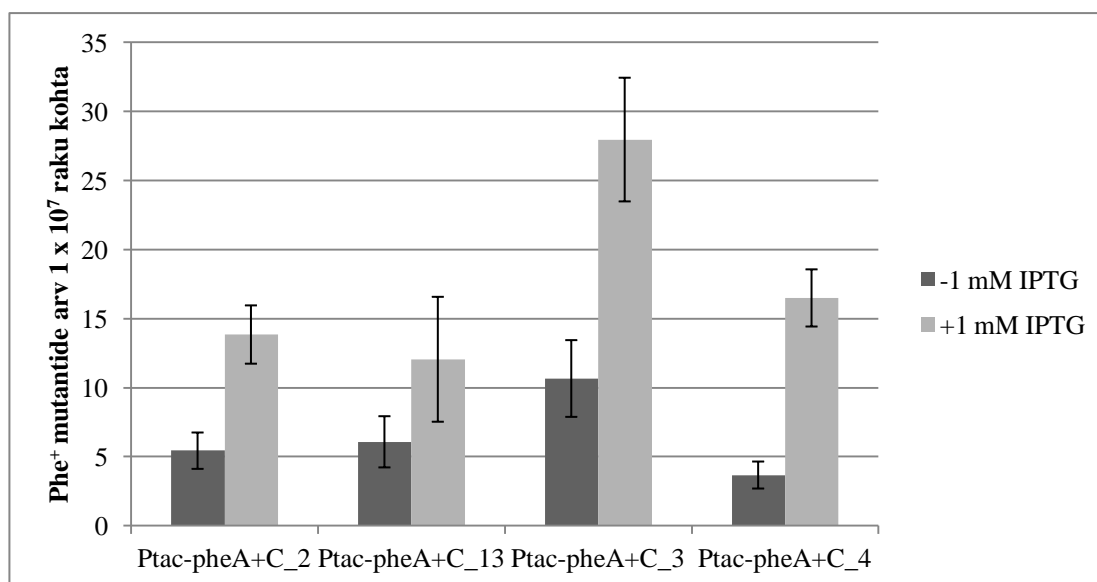
Joonis 10. Fenooli monooksügenaasi ekspressiooni testimine *P. putida* kasvavatest rakkudest Western blot meetodil. Kasutasime 50 µg totaalselt rakulüsaati, antikehaks oli *pheA* vastane polükloonaalne antikeha. 1) valgu suurusmarker; 2) IPTG-ta kasvanud negatiivne kontroll PaW85; 3) IPTG-ga kasvanud negatiivne kontroll PaW85; 4) IPTG-ta kasvanud Ptac-*pheA*+C_2 Phe⁺ mutant; 5) IPTG-ga kasvanud Ptac-*pheA*+C_2 Phe⁺ mutant. Punase kastiga on rõhutatud PheA ekspressioonitaseme erinevus IPTG juuresolekul ja ilma kasvanud rakkudes.

Selleks, et uurida testgeeni *pheA* transkriptsioonitaseme mõju mutatsioonisagedusele kasvavas kultuuris, kasvasime baktereid M9-CAA vedelsöötmes kas koos 1 mM IPTG-ga või ilma. Järgnevalt plaatsime umbes 1×10^7 testsüsteemi sisaldava tüve rakku koos 1×10^9 taustakuga (ilma testsüsteemida PaW85) fenooli ainsa süsinikuallikana sisaldavatele tassidele, kuhu ei olnud lisatud IPTG-d. Taustakud on vajalikud selleks, et tagada kõikides katsetes samad tingimused. Esimesed kolooniad olid fenooli tassidel nähtavad 7 päeval ning kolooniad kasvasid korralikult välja alles 8-ndaks päevaks. Järgnevalt lugesime igale tassile 8. päevaks ilmunud kolooniad ja jagasime nende arvu testsüsteemi sisaldavate rakkude hulga, et saada mutantide arv 1×10^7 raku kohta. Katset kordasime vähemalt kolm korda ning iga kord oli katses ühe tüve kohta 10 paralleelkultuuri.

Selleks, et näha, kas mutatsioonisagedused on erinevatel tüvedel üksteisest ka statistiliselt erinevad, analüüsisime tulemusi multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05 („Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.20). *P*-väärtused leidsime logaritmitud väärtustest Tukey HSD testiga programmis Post-hoc. Lähtusime sellest, et kui *P*-väärtus on $< 0,05$, siis on mutatsioonisagedused teineteisest statistiliselt erinevad.

Selektiivsöötmel 8. päevaks tekkinud Phe⁺ mutantide arv 1×10^7 raku kohta on esitatud joonisel 11 tulpdiaagrammina ning arvulised väärtused on toodud tabelis lisa 2. Saadud tulemuste põhjal ilmnes kõikidel tüvedel statistiliselt oluline erinevus IPTG-ta ja IPTG-ga kasvatatud kultuuride vahel, kusjuures Phe⁺ reverantide tekkesagedus suurenes

testgeeni *pheA* transkriptsioonitaseme suurendamisel (IPTG juuresolekul kasvatatud rakud). IPTG efekt ilmnes tugevamalt transkriptsiooni ja replikatsiooni vastassuunalisuse puhul. Transkriptsiooni ja replikatsiooni samasuunalisuse puhul (tüved Ptac-*pheA*+C_2 ja 13) tekkis vastavalt 2,5 ja 2 korda rohkem kolooniaid koos IPTG-ga kasvatatud kultuuride puhul, võrreldes kultuuridega, kus IPTG-d ei olnud lisatud (*P*-väärtused 0,001 ja 0,018). Samas transkriptsiooni ja replikatsiooni vastassuunalisuse puhul (tüved Ptac-*pheA*+C_3 ja 4) tekkis IPTG lisamisel vastavalt 2,6 ja 4 korda rohkem mutante (*P*-väärtus mõlemal juhul < 0,001). Seega saab öelda, et testgeeni transkriptsiooni suurendamisel kasvab ka selle mutatsioonisagedus ning transkriptsiooni ja replikatsiooni vastassuunalisuse puhul on transkriptsiooni mõju mutatsioonisagedusele suurem võrreldes sellega kui mõlemad protsessid toimuvad samas suunas.



Joonis 11. 1 mM IPTG-ga ja IPTG-ta kultuurides tekkinud Phe⁺ kolooniate arvu keskmised väärtused 1 x 10⁷ raku kohta. Kolooniad on loetud 8-ndal päeval pärast plaatimist fenooli sisaldavale minimaalsöötmel. Tüvedes Ptac-*pheA*+C_2 ja 13 on replikatsiooni ja transkriptsiooni suund sama, tüvedes Ptac-*pheA*+C_3 ja 4 aga vastassuunas. Joonisele on märgitud ka 95% usalduspiirid.

2.3.2 Mfd mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri *P. putida* kromosoomis, kasutades raaminihkemutatsioone detekteerivat testsüsteemi

Meie üheks eesmärgiks oli ka uurida, kuidas mõjutab *P. putida* rakkudes mutatsioonisagedust valk Mfd. Mfd tunneb ära DNA-l peatunud RNA polümeraasi ja taastab transkriptsiooni elongatsiooni või, juhul kui DNA ahelas on viga, osaleb NER suunamises

vigasele kohale ja seeläbi soodustab vea parandamist. Mfd mõju uurimiseks mutatsioonisagedusele deleteerisime *P. putida* genoomist *mfd* geeni. *mfd* geeni deleteerimise protseduur on kirjeldatud töö osas „Materjal ja meetodika“, peatükis 2.2.3 ning ülevaatlik joonis meetodi etappidest on lisas 1. Kuna me oleme oma katsetes näinud, et mutatsioonisagedus varieerub kromosoomi erinevates piirkondades (Juurik jt., 2012), siis selleks, et erinevate katsete tulemusi saaks omavahel võrrelda, deleteerisime *mfd* geeni P_{tac} -*pheA*+C testsüsteemi sisaldavatest tüvedest, mida kasutasime ka eelnenud katsetes (tüved P_{tac} -*pheA*+C_2, 3, 4 ja 13).

Testgeeni transkriptsioonitaseme mõju uurimiseks mutatsioonisagedusele plaatisime 1×10^7 P_{tac} -*pheA*+C testsüsteemi sisaldavat *mfd* deletsiooniga rakku, mida olime eelnevalt vedelsöötmes kasvatanud ilma või koos 1 mM IPTG-ga, ja 1×10^9 taustrakku (testsüsteemita PaW85) fenooli sisaldavale minimaalsöötmele. Erinevalt P_{tac} -*pheA*+C tüvedest, kus *mfd* oli olemas, oli *mfd* deletsiooniga tüvede puhul aimata väikeseid kolooniaid alles 9-ndal päeval. Ka 10-ndaks päevaks ei olnud kolooniad veel piisavalt palju kasvanud, et neid oleks saanud lugeda. Kuna ka 10. päeval jäid kolooniad väga väikeseks, ei olnud võimalik aru saada kui palju kolooniaid oli ilmunud fenooli tassile 9. päeval ja kui paljud oli lisandunud 10. päeval. Seetõttu ei suutnud me eristada Phe^+ kolooniaid, milles olid mutatsioonid tekkinud kasvavates rakkudes, kolooniatest, kus mutatsioonid olid tekkinud rakkude plaatimisjärgselt statsionaarses faasis. Et kiirendada kolooniate väljakasvu ja eristada täpsemalt kasvavas kultuuris tekkinud mutatsioone statsionaarse faasi mutatsioonidest, plaatisime P_{tac} -*pheA*+C Δ *mfd* tüved fenooli minimaaltassidele (*phe*-tassidele), kuhu lisasime ka 0,5 mM IPTG-d, et *pheA* geeni transkribeeritaks tugevalt P_{tac} promootorilt. Sel juhul ilmusid esimesed kolooniad fenooli sisaldavatele minimaalsöötmele juba kolmandaks päevaks. Oletasime, et hiljem tekkinud Phe^+ kolooniad on seotud mutatsioonide tekkega statsionaarses faasis, kus rakud on juba selektiivsöötmel. Katset kordasime vähemalt kolm korda ja korraga oli katses igast tüvest 10 paralleelkultuuri.

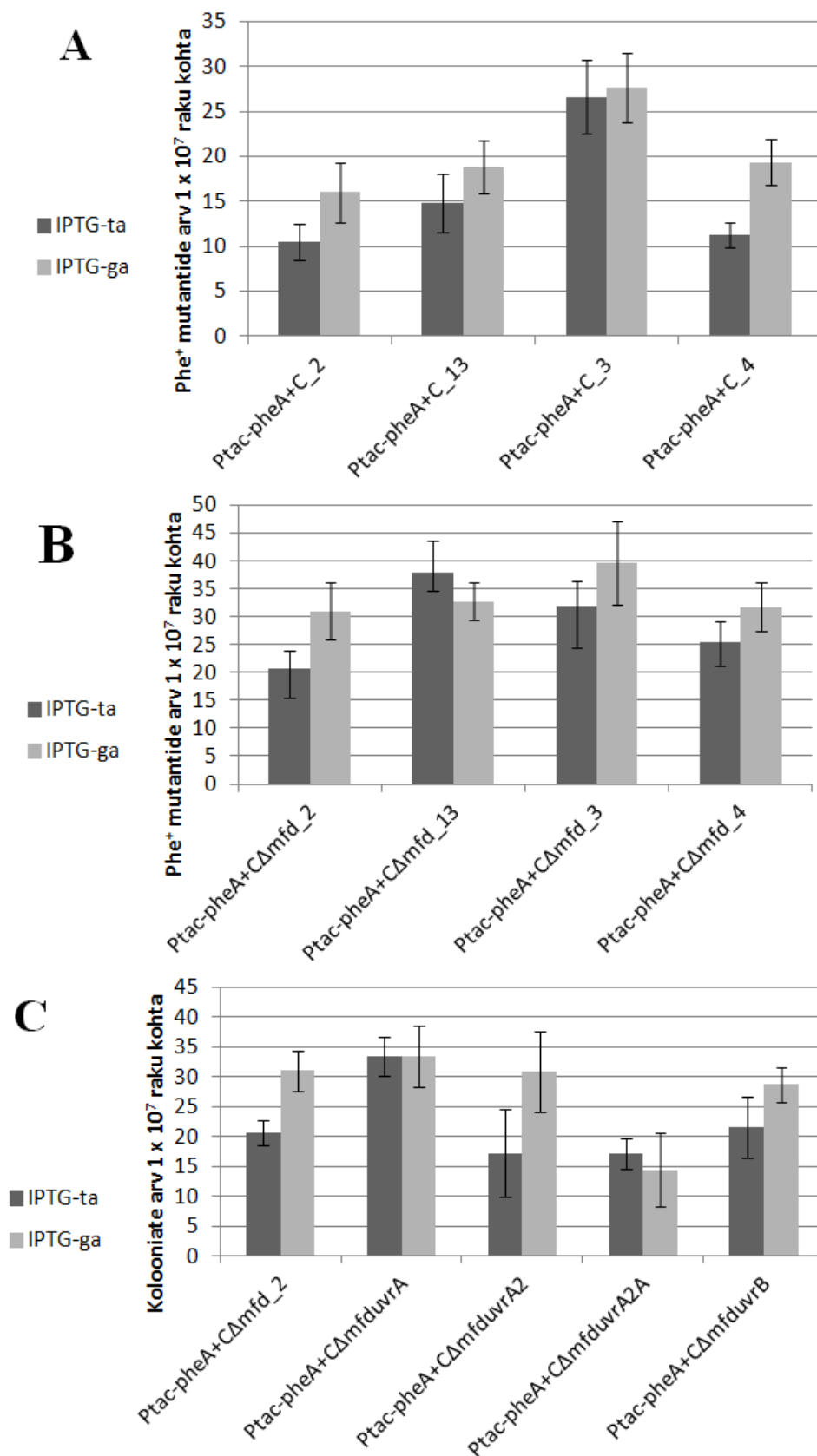
Fenooli ja 0,5 mM IPTG-d sisaldavatele selektiivtassidele 3. päevaks ilmunud P_{tac} -*pheA*+C ja P_{tac} -*pheA*+C Δ *mfd* tüvede keskmine kolooniate arv 1×10^7 raku kohta on toodud joonistel 12A ja 12B diagrammina ning arvulised väärtused on esitatud tabelina ka lisas 2. P_{tac} -*pheA*+C tüvede puhul on näha, et IPTG lisamisega *phe*-tassidele on kadunud peaaegu kõikidel tüvedel IPTG-ga ja IPTG-ta kasvatatud kultuuridel erinevus mutatsioonisageduses ($P > 0,05$), mida nägime varasemates katsetes, kus *phe*-tassidele ei olnud IPTG-d lisatud. Ainuke tüvi, millel nägime statistiliselt olulist erinevust, oli P_{tac} -*pheA*+C_4 ($P = 0,0014$). Võrreldes varasemate katsetega, kus Phe^+ mutante selekteeriti fenool-minimaaltassidel, kuhu ei olnud

IPTG-d lisatud (ja kus kolooniaid sai loendada alles 8. päeval pärast plaatimist), oli IPTG-d sisaldavatel söötmetel 3. päevaks rohkem kolooniaid. Eeskätt puudutas see neid katseid, kus rakukultuuri ei olnud enne plaatimist IPTG-d lisatud. Seega ei saa me välistada võimalust, et osa 3. päeval selektiivsöötmele ilmunud Phe⁺ kolooniatest on seal hakanud kasvama mutatsioonide tõttu, mis on tekkinud rakkudes plaatimisjärgselt.

Selleks, et uurida, kas testgeeni transkriptsioonitase mõjutab mutatsioonisagedust Mfd puudumisel, võrdlesime testsüsteemi erinevates kromosoomi piirkondades sisaldavate Ptac-pheA+CΔmfd tüvede Phe⁺ mutantide tekkesagedusi, kus sama tüve rakud olid kasvatatud enne rakkude plaatimist kas IPTG juuresolekul või ilma. Statistiliselt oluline erinevus enne plaatimist IPTG-ta ja IPTG-ga kasvanud kultuuride vahel ilmnis ainult tüvel Ptac-pheA+CΔmfd_2 ($P = 0,03$).

Uurisime ka seda, kas Mfd puudumine mõjutab mutatsioonisagedust võrreldes algse tüvega. Selgus, et Ptac-pheA+C tüvede ja nendest konstrueeritud Ptac-pheA+CΔmfd tüvede mutatsioonisageduste omavahelisel võrdlemisel oli statistiliselt oluline erinevus olemas, mida on näha ka joonistelt 12A ja 12B. *mfd* deletantide keskmine Phe⁺ mutantide arv osutus kõrgemaks võrreldes *mfd* geeni sisaldavate tüvede mutatsioonisagedusega. Vedelsöötmes ilma IPTG-ta kasvanud (*pheA* geeni transkriptsiooni taset ei ole suurendatud, tumedad tulbad) Ptac-pheA+C ja vastavate Ptac-pheA+CΔmfd tüvede omavahelisel võrdlusel oli testgeeni samasuunalise replikatsiooni ja transkriptsiooniga tüvedel 2 ja 13 Phe⁺ mutantide tekkesagedus 2 ja 2,6 korda suurem *mfd* geeni puudumisel (P -väärtused mõlemal $< 0,001$). Tüvede 3 ja 4 puhul, kus testgeeni transkriptsioon ja replikatsioon on vastassuunalised, suurenes mutatsioonisagedus *mfd* puudumisel tüves 4, kus erinevus oli 2,3 kordne ($P < 0,001$).

Tüvede võrdlemisel, mis olid vedelsöötmes kasvanud IPTG juuresolekul, et suurendada *pheA* geeni transkriptsioonitaset (heledad tulbad), oli samuti kõikidel tüvedel peale tüve 3 Phe⁺ mutantide tekkesagedus statistiliselt oluliselt suurenenud Mfd puudumisel ($P < 0,001$). Testgeeni samasuunalise replikatsiooni ja transkriptsiooniga tüves 2 tekkis *mfd* deletsiooniga tüves 1,9 ja tüves 13 tekkis 1,7 korda rohkem Phe⁺ mutante kui tüves, kus see geen oli alles. Testgeeni vastassuunalise replikatsiooni ja transkriptsiooniga tüves 3 tekkis *mfd* deletandis 1,4 ja tüves 4 tekkis 1,6 korda rohkem Phe⁺ mutante.



Joonis 12. Tüvede Ptac-pheA+C, Ptac-pheA+CΔmfd ja Ptac-pheA+CΔmfduvr Phe⁺ mutantide tekkesageduse keskmised väärtused 1 x 10⁷ raku kohta. A) Ptac-pheA+C tüvede keskmine Phe⁺ kolooniade tekkesagedus (avaldatud andmed Juurik jt., 2012, lisa 3); B)

Ptac-pheA+CΔmfd tüvede keskmine Phe⁺ kolooniate tekkesagedus; C) Ptac-pheA+CΔmfd_{uvr} tüvede keskmine Phe⁺ kolooniate tekkesagedus. Kolooniad on loetud 3. päeval pärast rakkude plaatimist fenooli sisaldavatele minimaalsöötmetele, kuhu on lisatud ka 0,5 mM IPTG. Märgitud on 95% usalduspiirid.

Kokkuvõtvalt saab öelda, et *mfd* geeni deleteerimisel suurenes mutatsioonisagedus 1,4-2,6 korda ja seda nii juhul kui me ei suurendanud testgeeni *pheA* transkriptsiooni taset (kasvatasime kultuuri enne plaatimist ilma IPTG-ta) kui ka juhul, kus me suurendasime *pheA* geeni transkriptsiooni taset, kasvatades rakke enne plaatimist IPTG juuresolekul.

2.3.3 TC-NER mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteris *P. putida* kromosoomis, kasutades raaminihkemutatsioone detekteerivat testsüsteemi

Selleks, et uurida, kuidas mõjutab testgeeni *pheA* mutatsioonisagedust Mfd vahendatav TC-NER, konstrueerisime tüvest Ptac-pheA+CΔmfd₂ NER valkude suhtes defektsed tüved, milles olid *uvrA*, *uvrA2*, *uvrA* ja *uvrA2* (topeltmutant) ning *uvrB* geenid katkestatud. *uvrA2* on bakteris *P. putida* *uvrA* geeni homoloog ning UvrA2 aminohappeline järjestus on 44% ulatuses sarnane UvrA valgu järjestusega. Täpsem info NER defektsete tüvede konstrueerimisest on toodud osas „Materjal ja meetodika“, peatükis 2.2.4. Tahtsime näha, kas Mfd puudumisest põhjustatud mutatsioonisageduse suurenemine *P. putida* rakkudes võiks olla seotud TC-NER-i puudumisega. Sel juhul peaksime me nägema, et mutatsioonisagedus ei muutu tüvede puhul, kus lisaks Mfd-le on puudu ka NER-i valgud. Kui aga ilmnevad erinevused Mfd üksikmutandi ja sellest konstrueeritud NER valkude suhtes defektsete tüvede mutatsioonisageduste vahel, siis mõjutab uuritud mutatsiooniprotsesse ka globaalne NER. Lisaks uurisime ka testgeeni *pheA* transkriptsioonitaseme mõju mutatsioonisagedusele. Selleks kasvatasime *mfd* ja *uvr* geenide suhtes defektseid tüvesid vedelsöötmes ilma või koos 1 mM IPTG-ga ning plaatisime 1 x 10⁷ rakku koos 1 x 10⁹ taustakuga (PaW85) fenool-minimaaltassidele, mis sisaldasid IPTG-d. Sarnaselt eelpool kirjeldatud katsele lugesime 3. päeval selektiivsöötmele ilmunud kolooniaid. Katset kordasime vähemalt 3 korda kümne paralleelkultuuriga.

Fenooli ja IPTG-ga selektiivsöötmele 3. päevaks tekkinud Phe⁺ mutantide arv 1 x 10⁷ raku kohta on toodud joonisel 12C ning arvulised väärtused on esitatud lisas 2.

Ühegi Ptac-pheA+CΔmfd_{uvr} tüve puhul ei ilmnenud statistiliselt olulist erinevust enne plaatimist IPTG-ta ja IPTG-ga kasvatatud kultuuride vahel. Ptac-pheA+CΔmfd_{uvr} tüvede võrdlemisel Ptac-pheA+CΔmfd₂ tüvega ilmnes statistiliselt oluline erinevus ilma IPTG-ta

kasvanud kultuuridest ainult *uvrA* geeni katkestusega tüvel ($P < 0,001$), kus mutatsioonisagedus oli tõusnud UvrA puudumisel 1,6 korda. Phe^+ mutantide tekkesageduse tõus UvrA puudumisel viitab sellele, et antud mutatsiooniprotsess on põhjustatud globaalse NER-i puudumisest. Enne plaatimist IPTG-ga kasvanud kultuuridest, milledes testgeeni transkriptsioonitase peaks olema kõrgem, oli statistiliselt oluline erinevus Ptac-*pheA*+ Δmfd_2 tüvest *uvrA2A* defektsel topeltmutandil ($P < 0,001$), milles oli mutatsioonisagedus langenud 2,15 korda. UvrA2 puudumine vähendas mutatsioonisagedust ka siis, kui võrrelda mutatsioonisagedusi tüvedel Ptac-*pheA*+ Δmfd_{uvrA} ja Ptac-*pheA*+ Δmfd_{uvrA2A} . Seega näeme ka UvrA2 puhul, et tema osalus mutatsiooniprotsessides ei ole seotud ainult TC-NER-ga.

Saadud tulemused viitavad ka sellele, et testgeeni transkriptsioonitase mõjutab mutatsiooniprotsesse erinevalt sõltuvalt sellest, kas ja millised NER-i valgud on puudu. Kui *pheA* geeni transkriptsioonitaseme tõstmisel suurenes Mfd-defektses tüves Ptac-*pheA*+ Δmfd_2 mutatsioonisagedus, siis topeltmutandis, kus lisaks Mfd-le puudus ka UvrA või mõni teine NER-i valk, *pheA* geeni transkriptsioonitaseme tõstmine mutatsioonisagedust ei suurendanud. Samas ilmnis UvrA ja UvrA2 koospuudumisest põhjustatud mutatsioonisageduse langus võrreldes Mfd defektse üksikmutandiga kui *pheA* geeni transkriptsioonitaset oli kunstlikult suurendatud ($P < 0,001$), aga mitte siis kui *pheA* geeni transkriptsioonitaset ei olnud suurendatud. Statistiliselt oluline erinevus ilmnis ka Ptac-*pheA*+ Δmfd_{uvrA} ja Ptac-*pheA*+ Δmfd_{uvrA2A} IPTG-ga kasvatatud tüvede omavahelisel võrdlemisel ($P < 0,001$).

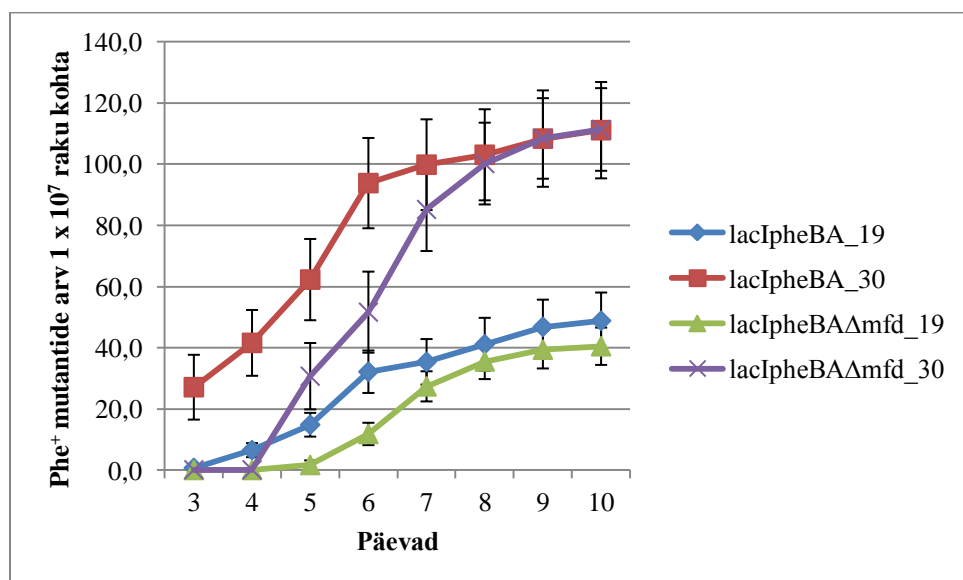
2.3.4 *mfd* mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteri *P. putida* kromosoomis, kasutades testsüsteemi, mis võimaldab tuvastada erinevat tüüpi mutatsioone

Kuna Δmfd tüvedel ilmnis kromosomaalse raaminihkemutatsioone tuvastava testsüsteemi kasutamisel märgatav mutatsioonisageduse tõus võrreldes tüvedega, kus *mfd* geen oli alles (joonis 12A ja 12B), tahtsime näha, kas ja kuidas mõjutab *mfd* puudumine mutatsioonisagedust teist tüüpi mutatsioonide puhul. Selleks võrdlesime mutatsioonisagedust Mfd olemasolul ja puudumisel, kasutades kromosomaalset testsüsteemi *lacI*- P_{tac} -*pheBA*, mis võimaldab tuvastada erinevaid mutatsioonitüüpe (Juurik jt., 2012). Selles testsüsteemis on *pheBA* geenid viidud tugeva P_{tac} promootori alla, mida reguleerib negatiivselt LacI. Selleks, et bakter oleks võimeline fenoolil kasvama, peab toimuma mutatsioon kas *lacI* geenis, et *lacI* inaktiveerida, või mutatsioon LacI repressori seondumisasal, mistõttu LacI valk ei saa enam P_{tac} promootorile seonduda ning promootorilt indutseeritakse *pheBA* geenide transkriptsioon. Mutatsioonisageduse mõõtmiseks valisime ühe tüve, milles replikatsioon ja transkriptsioon

olid samas suunas (lacIpheBA_19) ja teise tüve, milles *lacI* replikatsioon ja transkriptsioon olid vastassuunalised (lacIpheBA_30) (Juurik jt., 2012). Neist tüvedest tegime ka *mfd* deletandid. Plaatisime 1×10^7 testsüsteemi sisaldavat rakku koos 1×10^9 taustarakuga (PaW85 rakud) fenooli sisaldavale minimaalsöötmel. Selles katses me IPTG-d söötmele ei lisanud (P_{tac} on IPTG-ga indutseeritav ning IPTG juuresolekul hakkavad kõik testsüsteemiga rakud phe-minimaaltassil kasvama). Kolooniate moodustumist tassidele jälgisime 3-10 päeval. Katset kordasime vähemalt 3 korda ning korraga oli katses igast tüvest 10 paralleelkultuuri.

Phe^+ mutantide akumulatsioon 1×10^7 raku kohta on esitatud joonisel 13 ning iga päeva kohta eraldi tekkinud kolooniate arv on toodud tabelis 4.

Joonisel 13 on näha, et sõltumata sellest, kas testgeeni replikatsioon ja transkriptsioon olid samasuunalised või vastassuunalised, oli Δmfd tüvedel tekkinud katse 10-ndaks päevaks sama palju Phe^+ mutante kui tüvedel, kus *mfd* geen oli alles. Selgelt on ka näha, et testgeeni *lacI* replikatsiooni ja transkriptsiooni vastassuunalisus mõjutab LacI-d inaktiveerivate mutatsioonide sagedust tunduvalt rohkem kui samasuunalisus. Testgeeni vastassuunalise transkriptsiooni ja replikatsiooniga tüves lacIpheBA_30 tekib 2,3 ($P < 0,001$) korda ja tüves lacIpheBA Δmfd _30 tekib 2,8 ($P < 0,001$) korda rohkem Phe^+ mutante võrreldes tüvedega lacIpheBA_19 ja lacIpheBA Δmfd _19, kus *lacI* replikatsioon ja transkriptsioon toimuvad samasuunaliselt.



Joonis 13. Tüvede lacIpheBA ja lacIpheBA Δmfd Phe^+ kolooniate akumulatsioon fenooli sisaldavatel minimaalsöötmel. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud

eelneva päeva kolooniate arvule. Nii on 10-ndal päeval esitatud kolooniate arv kogu katseperioodil tekkinud kolooniate arv. Joonisele on märgitud 95% usalduspiir.

Kui võrrelda tekkinud Phe⁺ mutantide arvu päeva kohta (tabel 4), siis mõlemal Mfd defektsel tüvel (19 ja 30) moodustub katse esimestel päevadel statistiliselt oluliselt vähem kolooniaid kui tüvedel, kus Mfd on olemas ($P < 0,001$). Kuna need erinevused ilmsesid aga ainult katse alguses ja hiljem Phe⁺ mutantide teke kiirenes Mfd defektsetes tüvedes, siis kontrollisime võimalust, et *mfd* puudumine aeglustab Phe⁺ mutantide kasvu. Selleks, et uurida, mitu päeva kulub Phe⁺ mutantidel, et kasvada läbi taustrakkude kihi, tegime rekonstruktsioonikatse („Materjal ja meetodika“, 2.2.19), kus taastasime tingimused, milles selekteerisime Phe⁺ mutante. Selleks plaatsime Phe⁺ mutandid selektiivsöötmele koos taustrakkudega ja jälgisime, millal on Phe-selektiivtassidel näha esimesi kolooniaid. *lacIpheBA* tüvedel kasvasid kolooniad välja juba kolmandaks päevaks. *lacIpheBAΔmfd* tüvedel olid väikesed ja mõned üksikud suuremad Phe⁺ kolooniad näha katse 4-ndal päeval, kuid korralikult kasvasid Phe⁺ kolooniad välja alles 5-ndaks päevaks, mis tähendab, et *lacI-P_{tac}-pheBA* testsüsteemi sisaldavate *Δmfd* tüvede puhul on Phe⁺ mutantide kasv aeglasem.

Tabel 4. Phe⁺ mutantide teke tüvedes *lacIpheBA*_19 ja 30 ning nende Mfd-defektsetes variantides. Phe⁺ mutantide arv 1 x 10⁷ raku kohta on näidatud iga päeva kohta eraldi. Sulgudes on toodud 95% usalduspiir ning statistiliselt olulise erinevusega Phe⁺ mutantide arv Mfd olemasolul ja puudumisel on märgitud tumedalt. Tüves *lacIpheBA*_19 on *lacI* geeni transkriptsiooni ja replikatsiooni suund sama, tüves *lacIpheBA*_30 aga vastupidine.

Tüvi	Päev								Kokku
	3	4	5	6	7	8	9	10	
19	0,71 (0,82)	5,81 (1,78)	8,29 (3,70)	17,33 (5,30)	3,24 (1,58)	5,73 (4,99)	5,71 (2,23)	1,98 (1,12)	48,81 (9,22)
Δmfd19	0,04 (0,09)	0,00 (0,00)	1,63 (1,51)	10,14 (3,04)	15,56 (3,00)	8,14 (3,19)	3,85 (1,36)	1,12 (0,65)	40,48 (6,10)
30	27,10 (10,59)	14,48 (3,09)	20,69 (5,46)	31,53 (10,91)	6,02 (1,77)	3,24 (1,30)	5,29 (2,98)	2,67 (0,99)	111,02 (15,72)
Δmfd30	0,11 (0,24)	0,00 (0,00)	30,58 (10,83)	20,93 (6,15)	33,59 (5,70)	14,98 (5,53)	8,21 (3,79)	2,94 (1,68)	111,34 (13,51)

Kokkuvõtvalt saab öelda, et kuna *lacI-P_{tac}-pheBA* testsüsteemi sisaldavate Mfd defektsete tüvede puhul tekkinud Phe⁺ mutantide kasv on taustrakke sisaldaval selektiivsöötmel aeglasem, viitavad meie tulemused sellele, et antud testsüsteemi puhul ei mõjuta Mfd puudumine Phe⁺ mutantide tekkesagedust.

2.3.5 *mfd* mõju uurimine mutatsioonisagedusele bakteris *P. putida*, kasutades plasmiidset testsüsteemi

Kasutades kromosomaalseid testsüsteeme, nägime, et *mfd* geeni puudumine suurendab bakteris *P. putida* testgeenis mutatsioonisagedust raaminihkemutatsioonide puhul. Me ei näinud erinevusi mutatsioonisageduses, kus testsüsteem võimaldas korraga detekteerida väga erinevaid mutatsioone. Kuna mutatsiooniprotsessid bakteri kromosoomis ja plasmiidis võivad toimuda erinevalt, huvitas meid, kas Mfd puudumine võiks mõjutada mutatsioonide teket plasmiidse testsüsteemi puhul. Plasmiididel on tavaliselt rakus palju koopiasid ning nende replikatsioonis võivad osaleda teised valgud kui need, mis osalevad kromosoomi replikatsioonis. Kasutasime plasmiidse testsüsteemina asendusmutatsioone tuvastavat TAG testsüsteemi (Tegova jt., 2004). Selle testsüsteemi puhul on mõõduka koopiaarvuga (10-12 koopiat raku kohta) plasmidi pKT240 viidud *pheA* geen, milles on 22. leutsiini kodeeriv koodon CTG asendatud stopkoodoniga TAG ning *pheA* transkriptsioon toimub konstitutiivselt töötavalt promootorilt.

Mfd mõju uurimiseks mutatsioonide tekkele plasmiidis viisime antud testsüsteemi sisaldava plasmidi pKTpheA22TAG algsesse tüvesse PaW85 ja *mfd* deletsiooniga tüvesse PaWmfd ning võrdlesime neis tüvedes Phe⁺ mutantide tekkesagedusi. Selleks plaatisime 0,5 ml üleöö kasvanud rakukultuuridest fenooli minimaalsöötmele, mis sisaldas lisaks fenoolile plasmidi selektsiooniks karbenitsilliini ja jälgisime Phe⁺ mutantide akumulereerumist 2-10 päeval. Katset kordasime vähemalt 3 korda ning igast tüvest oli katses 10 paralleelkultuuri.

Phe⁺ mutantide akumulereerumine fenooli sisaldavatele minimaalsöötmetele on toodud joonisel 14 ning iga päeva kohta eraldi tekkinud Phe⁺ kolooniate arv on toodud tabelis 5.

mfd geeni puudumine ei mõjutanud Phe⁺ mutantide tekkesagedust võrreldes algse tüve mutatsioonisagedusega. Nii tüvel PaW85 kui ka tüvel PaWΔmfd oli katse viimaseks päevaks (10. päev) tekkinud ligikaudu sama palju Phe⁺ mutante ning statistiliselt oluline erinevus mutantide keskmiste arvude vahel puudus. Lisaks ei ilmnenu statistiliselt olulist erinevust ka igal üksikul päeval tekkinud Phe⁺ kolooniate arvus (tabel 5). Nende tulemuste põhjal

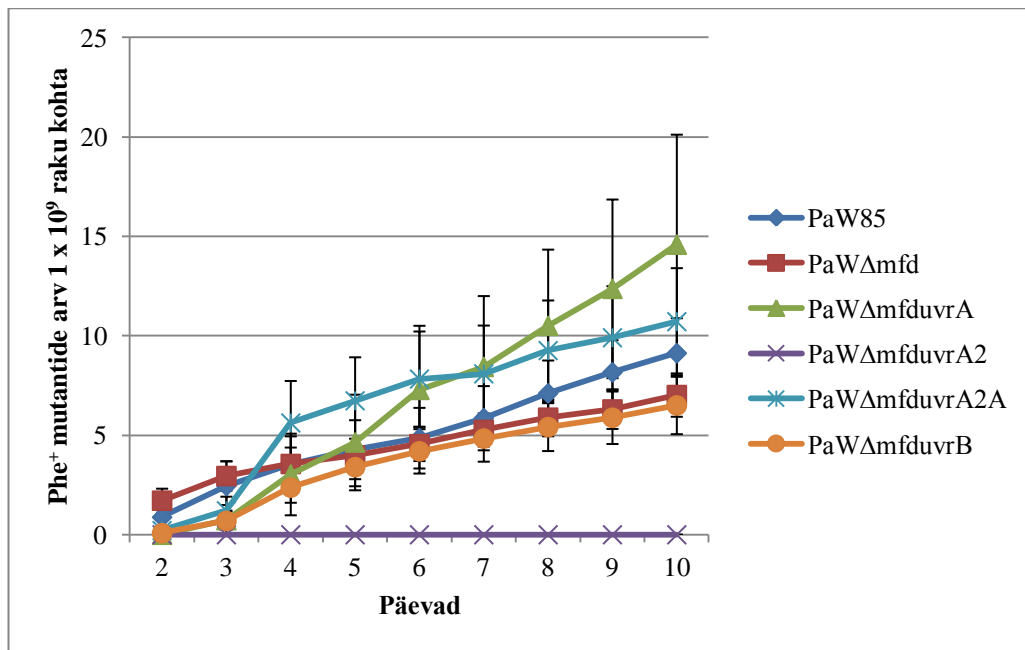
järeldame, et *mfd* geeni puudumine ei mõjuta plasmiidse testsüsteemi puhul sihtmärkgeeni mutatsioonisagedust.

2.3.6 Mfd ja NER-i valkude koosmõju uurimine mutatsioonisagedusele *P. putida* rakkudes, kasutades plasmiidset testsüsteemi TAG

Kuna meie laboris varem läbi viidud katsete puhul ilmnes, et NER valgud UvrA2 ja UvrB soodustavad asendusmutatsioone ja 1-bp deletsioone tuvastavate plasmiidsete testsüsteemide puhul mutatsioonide teket (Tark jt., 2008), otsustasime nende valkude mutatsioonide tekkel osalemise mehhanismide täpsemaks väljaselgitamiseks uurida Mfd ja NER valkude koosmõju plasmiidis pKTpheA22TAG tekkivate Phe⁺ mutatsioonidele. Selleks viisime Uvr ja Mfd topeltdefektsetesse tüvedesse elektroporatsiooni teel plasmidi pKTpheA22TAG ning plaatisime vähemalt kolmel korral 10-ne paralleelkultuuri rakud karbenitsilliini sisaldavale fenooli minimaalsöötmele ja lugesime kolooniaid 2-10 päeval.

Tekkinud Phe⁺ kolooniate keskmine arv iga päeva kohta on toodud tabelis 5 ning Phe⁺ mutantide akumulatsioonigraafikud on esitatud joonisel 14. Varasematest katsetest (Tegova jt. 2004) on teada, et antud testsüsteemi puhul sisaldavad 2. päeval pärast rakkude plaatimist selektiivsöötmetele ilmunud Phe⁺ kolooniad mutatsioone, mis tekkisid kasvavates rakkudes enne nende plaatimist selektiivsöötmetele, kuid alates 3. päevast selektiivsöötmetele ilmunud Phe⁺ koloonite puhul on mutatsioonid tekkinud plaatimisjärgselt, statsionaarse faasi rakkudes.

Kogu katse jooksul selektiivsöötmele akumulunud Phe⁺ kolooniate keskmise arvu poolest erines statistiliselt PaWΔ*mfd* tüvest ainult topeltmutant, kus puudus valk UvrA2 ($P < 0,001$). *uvrA2* geeni katkestamine Mfd defektsest tüvest vähendas drastiliselt Phe⁺ mutantide tekkesagedust, mis jäi allapoole detekteerimispiiri, ja seda ka juhul kui plaatisime rakke fenooli ja karbenitsilliini sisaldavale selektiivtassile kaks korda rohkem. Iga päeva kohta eraldi tekkinud Phe⁺ kolooniate arv ei ole PaWΔ*mfd* ja teiste PaWΔ*mfd*Uvr tüvede vahel olulisi erinevusi kui oli võrreldud Phe⁺ kolooniate arvu alates 3. katsepäevast. Need tulemused näitavad, et sarnaselt varasematele katsetele ilmneb UvrA2-l oluline roll statsionaarse faasi mutatsioonide tekkele antud testsüsteemi puhul ka siis kui Mfd puudub. Samas ei ilmnunud Mfd puudumisel erinevalt varasematest katsetest, kus bakterites oli Mfd funktsionaalne, UvrB mõju statsionaarse faasi mutageneesile.



Joonis 14. Plasmidse TAG testsüsteemiga Phe⁺ kolooniate akumulatsioon fenooli minimaalsöötmeil. Graafikul on esitatud 2-10 päeval tekkinud Phe⁺ kolooniate arvu keskmine 1×10^9 raku kohta. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva päeva arvule ning 10-nda katsepäeva kolooniate arv esindab kogu katseperioodil tekkinud kolooniate arvu. Joonisele on märgitud 95% usalduspiirid.

Tabel 5. Phe⁺ mutantide teke plasmidset testsüsteemi TAG sisaldavates tüvedes. Phe⁺ mutantide arvu väärtus 1×10^9 raku kohta on näidatud iga päeva kohta eraldi. Sulgudes on toodud 95% usalduspiir. Statistiliselt olulise erinevusega Phe⁺ mutantide arv PaWΔmfduvr tüvedes võrrelduna PaWΔmfd tüvega on märgitud tumedalt.

Tüvi	Päevad									Kokku
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PaW85	0,86 (0,53)	1,60 (1,06)	1,10 (0,89)	0,73 (0,42)	0,53 (0,38)	1,02 (0,56)	1,24 (0,54)	1,09 (0,49)	0,96 (0,46)	9,12 (1,80)
Δmfd	1,70 (0,60)	1,22 (1,06)	0,60 (0,28)	0,43 (0,22)	0,56 (0,34)	0,72 (0,33)	0,61 (0,28)	0,42 (0,21)	0,71 (0,40)	6,98 (1,08)
ΔmfduvrA	0,00 (0,00)	0,76 (0,81)	2,21 (1,75)	1,66 (0,73)	2,19 (1,59)	0,96 (0,60)	2,13 (1,25)	1,40 (0,88)	2,02 (1,38)	13,32 (5,27)
ΔmfduvrA2	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

$\Delta mfd uvrA2A$	0,21 (0,24)	1,00 (0,69)	4,42 (2,09)	1,11 (0,58)	1,09 (0,54)	0,26 (0,23)	1,17 (0,47)	0,64 (0,41)	0,80 (0,48)	10,69 (2,75)
$\Delta mfd uvrB$	0,08 (0,15)	0,62 (0,46)	1,68 (0,63)	1,03 (0,57)	0,80 (0,52)	0,64 (0,33)	0,57 (0,34)	0,47 (0,33)	0,62 (0,43)	6,50 (1,48)

Samas nägime olulisi erinevusi 2. päeval selektiivsöötmetele ilmunud Phe⁺ mutantide tekkesageduses. Võrreldes Mfd-defektse tüvega oli kõigis tüvedes, kus puudus lisaks Mfd-le ka mõni NER-i ensüümidest, mutatsioonisagedus statistiliselt oluliselt vähenenud. See efekt ilmnis isegi UvrA puudumisel, mis varasemates katsetes, kus Mfd mõju oli alles (Tark jt., 2008), mutatsioonisagedust ei vähendanud. Seega mõjutab Mfd olemasolu NER-i valkude osalust mutatsiooniprotsessides, kusjuures võrreldes kromosomaalse testsüsteemiga (joonis 12 B, C) ilmnevad erinevad efektid.

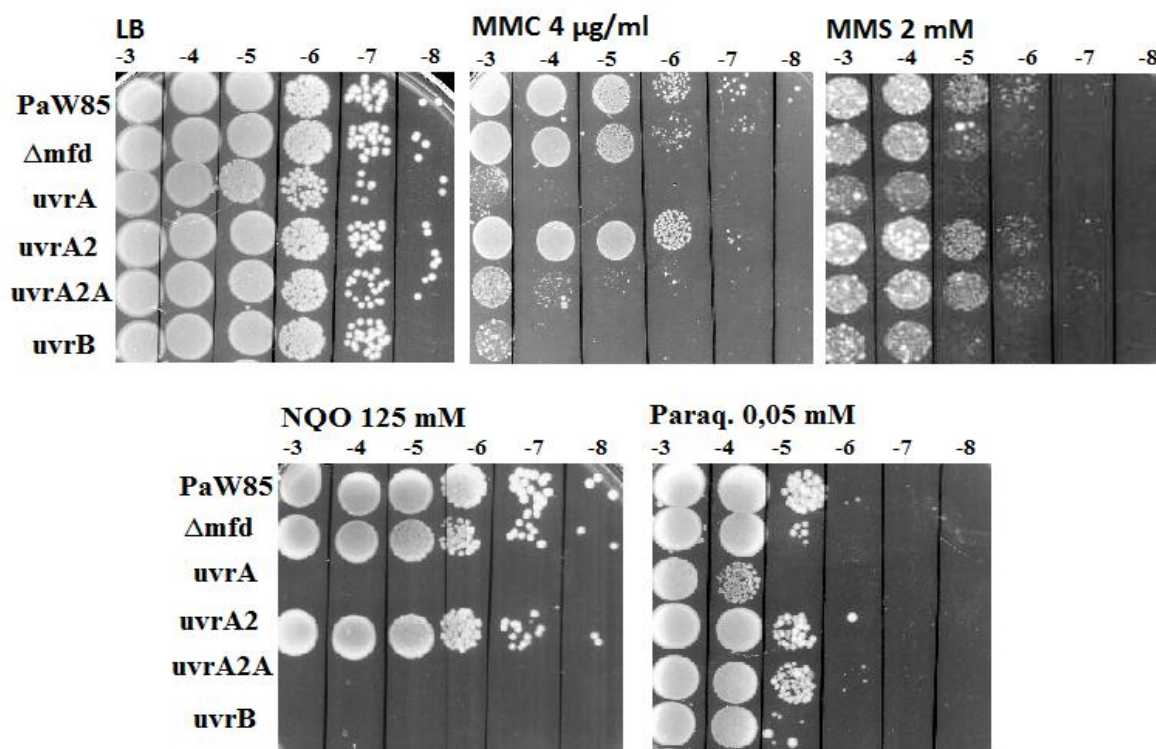
2.3.7 Mfd ja NER valkude mõju DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvusele

Bakterites osaleb NER mitmete DNA kahjustuste reparatsioonis nagu näiteks oksüdatiivsed ja alküleerivad kahjustused. Selleks, et uurida, millistele DNA kahjustustele on Δmfd tüvi ja sellest konstrueeritud *uvr* defektsed tüved tundlikud, viisime läbi kemikaalide taluvuse katse („Materjal ja meetoodika“ 2,2,18). Kasutasime järgmiseid kemikaale: mitomütsiin C (MMC, ristsiirded DNA-s); metüülmetaansulfonaat (MMS, alküülkahjustused); nitrokinoliin (NQO, 4-nitrokinoliin N-oksiid, kaheahelalised DNA katked, oksüdatiivsed kahjustused, DNA struktuuri muutused), paraquaat dikloriid x-hüdraat (katkete teke DNA-s, oksüdatiivsed kahjustused).

Võrdlesime erinevate bakteritüvede tundlikkust kemikaalidele eksponentsiaalselt kasvanud rakkude puhul. Kõigi NER ensüümide osas defektsete tüvede puhul puudus ka Mfd. Katsete tulemused on esitatud joonisel 15, millelt on näha, et eksponentsiaalses faasis kasvanud rakkude puhul vähendasid PaW Δmfd tüve rakkude eluvõimet võrreldes algse tüvega mitmed kemikaalid. Ristsidemeid põhjustaval mitomütsiin C-l ilmnis mõõdukas efekt. Ülejäänud tüvede puhul, välja arvatud PaW $\Delta mfd uvrA2$, suurendas MMC bakterite suremust võrreldes Mfd üksikmutandiga rohkem ning see võiks olla põhjustatud globaalse NER puudumisest. Alküülkahjustusi põhjustaval MMS-il PaW Δmfd tüve rakkude ellujäämisele võrreldes algse tüvega PaW85 mõju ei olnud. NER valkudest suurendas rakkude tundlikkust MMS-le üksnes UvrA puudumine. Erinevaid DNA kahjustusi põhjustavat nitrokinoliini talusid võrdselt algse tüvega PaW Δmfd ja PaW $\Delta mfd uvrA2$ tüvede rakud. Samas UvrA või UvrB puudumisel vähenes bakterite ellujäävus NQO juuresolekul mitmeid suurusjärke.

Paraquaadi toimest (katkete teke DNA-s, oksüdatiivsed kahjustused) olid kõik tüved, kaasa arvatu algne tüvi PaW85, tugevalt mõjutatud. UvrA2 või UvrA ja UvrA2 koospuudumisel talusid Mfd defektsed bakterid paraquaadi sarnaselt algsele tüvele, Mfd üksikmutandi ja Mfd ning UvrB topeltdefektse tüve ellujäävus oli aga ligikaudu ühe suurusjärgu võrra langenud võrreldes algse tüvega. Paraquaadi talus erinevalt teistest tüvedest oluliselt vähem Mfd defektne tüvi, kus puudus ka UvrA.

Statsionaarse faasi rakkude puhul me olulisi erinevusi kemikaalide taluvuses võrreldes eksponentsiaalse faasi rakkudega ei täheldanud (andmeid ei ole esitatud).



Joonis 15. Mfd ja NER valkude defektsusest põhjustatud *P. putida* eksponentsiaalse faasi rakkude tundlikkus DNA-d kahjustavatele kemikaalidele. Võrreldud on algset tüve PaW85, Mfd defektset tüve (PaWΔmfd) ning Mfd ja NER valkude (UvrA, UvrA2, UvrAUvrA2 ja UvrB) topeltdefektseid tüvesid. Märgitud on bakterikultuuride lahjendusaste. Bakterikultuure on söötmele pipeteeritud 10 µl.

Nagu eelpool kirjeldatud katsetest selgus, mõjutavad erinevate NER ensüümide ja Mfd puudumine rakkude ellujäämist erinevate katsesse võetud kemikaalide puhul erinevalt. Lisaks viitavad saadud tulemused sellele, et ilmselt on *P. putida* rakkudes lisaks seni teadaolevale NER-ile veel DNA reparatsiooniradu, kus võivad osaleda erinevad NER valgud.

2.4 Arutelu

Mutatsioonide teke on keeruline mitmeastmeline protsess, mis hõlmab DNA sihtmärkjärjestust ja erinevaid ensüüme, millel on roll DNA molekulide eellaste metabolismis, replikatsioonis, rekombinatsioonis ja reparatsioonis. Lisaks endogeensetele teguritele mõjutavad mutatsioonide teket ka rakuvälised tegurid nagu UV-kiirgus ja mutageensed ühendid. Juba pikemat aega on arutletud ka teemal, kuidas mõjutab mutatsioonisagedust transkriptsioon ja transkriptsioonikompleksi liikumise suund võrreldes replisoomiga. Kuigi erinevaid testsüsteeme kasutades on nähtud transkriptsioonist sõltuvat mutageneesi ja transkriptsiooniga seotud reparatsiooni, jääb transkriptsiooni üldine mõju mutatsioonisagedusele veel siiski selgusetuks.

Kirjandusest on teada, et transkribeeritavas piirkonnas on kaheaahelaline DNA lahti harutatud ning on seetõttu ka mutatsioonidele vastuvõtlikum. Kui RNA polümeraas ei ole mingil põhjusel võimeline transkriptsiooni jätkama, näiteks regulatoorse elemendi või vea tõttu DNA-l (Rudolph jt., 2007; Uptain jt., 1997), võib DNA pikemat aega mutageenidele kättesaadav olla. Probleemiks võivad olla ka transkriptsiooni initsiatsiooni kompleksid, mis on väga püsivad ja läbivad mitu abortiivset initsiatsiooni, enne kui RNA polümeraas edasi liigub (Murakami jt., 2002). Seega võiks suurenenud transkriptsioonitase mõjutada mutatsioonisagedust. Park jt. (2012) analüüsisid mutatsioonide teket pärmis (*Saccharomyces* sp.) ja leidsid, et transkriptsioonitaseme tõus põhjustas suurenenud mutatsioonisagedust. Kuna transkriptsioon põhjustab samaaegselt nii DNA parandamis (TCR) kui ka mutatsioonide teket, pakuti välja, et transkriptsioon on üldiselt mutageenne. Transkriptsioonist sõltuvat mutatsioonisageduse tõusu on kirjeldanud ka teised tööühmad (Klapacz ja Bhagwat, 2002; Srivatsan jt., 2010). Meie uurisime bakteris *P. putida* transkriptsioonitaseme mõju mutatsioonisagedusele kromosomaalse raaminihke mutatsioone tuvastava testsüsteemiga ja nägime suurendatud transkriptsioonitaseme puhul ka suurenenud mutatsioonisagedust (joonis 12A). Mutantide tekkesagedus tõusis transkriptsioonitaseme tõstmisel 2-4 korda. Sarnase tulemuse said ka Klapacz ja Bhagwat (2002), kes uurisid transkriptsiooni mõju mutatsioonisagedusele bakteris *E. coli*, kuid kasutasid selleks erinevalt meist plasmiidset asendusmutatsioone tuvastavat testsüsteemi.

Viimasel ajal on uuritud ka replikatsioonikahvli ja transkriptsioonikompleksi liikumise suuna mõju mutatsioonisagedusele. *In vivo* on leitud, et DNA ja RNA polümeraaside samasuunaline kokkupõrge mõjutab replikatsioonikahvli liikumist vähem kui vastassuunaline kokkupõrge (Mirkin ja Mirkin, 2005) ning sellest tulenevalt võiksid „pea-ees“ kokkupõrked

mutatsioonisagedusele suuremat mõju avaldada. Seda toetab ka fakt, et hädavajalikud geenid on lühemad (Paul jt., 2013) ja enamikes bakterites orienteeritud replikatsiooniga samas suunas (Guy ja Rotten, 2004). Meie katsetest transkriptsioonitaseme tõstmisel ilmnis suurem mõju mutatsioonisagedusele siis, kui replisoomi ja transkriptsioonikompleksi suund oli vastupidine (joonis 12A). Need tulemused, mis on praeguseks ka juba avaldatud (Juurik jt., 2012), on kooskõlas Paul jt. (2013) ning Srivatsan jt. (2010) tulemustega, kes kirjeldasid bakteris *B. subtilis* transkriptsiooni ja replikatsiooni vastassuunalisest kokkupõrkest põhjustatud mutatsioonisageduse tõusu.

Kuna eelpool kirjeldatud katsed kinnitasid, et transkriptsioon mõjutab mutatsiooniprotsesse, tekkis meil küsimus, kas ja kuidas võiks mutatsioonisagedust mõjutada transkriptsiooniga seotud DNA reparatsiooni faktor Mfd, mis seob otseselt omavahel reparatsiooni ja transkriptsiooni, soodustades RNA elongatsiooni või suunates vigasele kohale NER reparatsiooniraja (Park jt., 2002; Savery, 2007). Mfd mõju mutatsioonisagedusele on küll varem uuritud, kuid enamasti on keskendutud UV-kiirgusest põhjustatud mutageneesile. Bakteris *B. subtilis* uuriti statsionaarses faasis tekkivaid mutatsioone ning leiti, et Mfd puudumisel oli mutatsioonisagedus tunduvalt madalam ja järeldati, et funktsionaalne Mfd on vajalik statsionaarse faasi mutageneesiks selles bakteris (Ross jt., 2006). Sarnaselt on Mfd puudumisest põhjustatud mutatsioonisageduse langust täheldatud ka bakteris *Campylobacter jejuni* eksponentsiaalses faasis (Han jt., 2008). Meie aga nägime oma katsetes kromosomaalse raaminihkemutatsioone tuvastava testsüsteemiga, et eksponentsiaalses faasis suureneb Mfd puudumisel mutatsioonide teke nii transkriptsioonitaseme tõstmisel kui mittetõstmisel 1,4-2,6 korda, viidates Mfd olulisusele mutatsioonide ära hoidmises. Samas ei näinud me katsetes Mfd defektse tüvega, et testgeeni *pheA* transkriptsioonitaseme muutmine IPTG lisamisel mõjutaks mutatsioonisagedust. See võib aga tuleneda kasutatud testsüsteemi piirangutest Phe⁺ mutantide selektsioonil. Kuna testgeeni *pheA* transkriptsioonitase konstitutiivselt promootorilt oli madal (Phe⁺ kolooniad ilmusid Mfd-defektsete tüvede puhul fenool-minimaalsöötmetel nähtavale alles 9.-10. päeval), tuli Phe⁺ kolooniate kiiremaks väljakasvuks selektiivsöötmetele lisada IPTG-d, mis võimaldas *pheA* transkriptsiooni ka tugevamalt P_{tac} promootorilt. Samas võis Phe⁺ mutantide selektsioon IPTG juuresolekul vähendada erinevusi mutatsioonisageduste vahel, kui katses oli võrreldud IPTG juuresolekul ja ilma IPTG-ta kasvatatud rakukultuure.

Huvitaval kombel nägime kahe erineva kromosomaalse testsüsteemiga (P_{tac}-*pheA*+C, *lacI*-P_{tac}-*pheBA*) Mfd puudumisel mõju ka rakkude kasvukiirusele. Mfd defektsetes tüvedes selekteeritud Phe⁺ mutandid hakkasid võrreldes algse tüve Phe⁺ mutantidega hiljem kasvama (vt. näiteks joonis 13). Seega mõjutab Mfd puudumine teatud tingimustel rakkude kasvu.

On teada, et kromosoomi replikatsioon ja plasmidi replikatsioon toimuvad erinevalt. Plasmidist on rakkudes tavaliselt mitu koopiat ja replikatsioonil võivad osaleda võrreldes kromosoomiga teised valgud. Seetõttu uurisime Mfd mõju mutatsioonisagedusele ka plasmidis asuva testsüsteemi puhul. Eelnevalt juba mainitud Klapacz ja Bhagwat (2002) avaldatud artiklis näidati Mfd puudumisel plasmidsel testsüsteemil 2-4 kordset testgeeni mutatsioonisageduse tõusu. Meie aga ei täheldanud oma katsetes mingeid muutusi mutatsioonisageduses plasmidse testsüsteemi puhul kui Mfd oli puudu (joonis 14) ja järeldame sellest, et *mfd* geeni puudumine bakteris *P. putida* ei mõjuta antud plasmidse testsüsteemi puhul sihtmärkgeeni mutatsioonisagedust.

Üheks töös püstitatud eesmärgiks oli ka uurida, kuidas mõjutab Mfd-st sõltuv TC-NER mutatsioonisagedust. On teada, et NER osaleb rakkudes eksogeensete tegurite poolt põhjustatavate mutatsioonide parandamises. Samas on meie töörühmas varasemates uuringutes leitud, et lisaks NER-i klassikalisele rollile reparatsioonis on tal roll ka spontaansete mutatsioonide tekkes nii kasvavates kui statsionaarse faasi rakkudes (Tark jt., 2008). NER-i ensüümide osalust mutatsioonide tekkel oli uuritud plasmidsete testsüsteemide abil, millest asendusmutatsioonide tuvastamist võimaldav testsüsteem oli kasutusel ka käesolevas töös. Varasematest tulemustest lähtudes tekkis meil küsimus, kas NER-i valkude osalus mutatsioonide tekkel selle testsüsteemi puhul võis olla seotud Mfd-st sõltuva TC-NER-iga. Kuna aga Mfd puudumine plasmidse testsüsteemi puhul Phe⁺ mutantide tekkesagedust ei vähendanud (vt. eelmine lõik arutelust), siis ei saa NER-valkudest sõltuvat mutageenset rada seostada TC-NER-ga. Samas nägime (tabel 5), et Mfd puudumisel vähenes Phe⁺ mutatsioonide tekkesagedus kasvavates rakkudes siis, kui lisaks oli puudu ka mõni NER-i ensüümidest (UvrA, UvrA2 või UvrB). Saadud tulemused on üllatavad selles mõttes, et Mfd olemasolul UvrA puudumine hoopis suurendas mutatsioonisagedust (Tark jt., 2008). Statsionaarse faasi mutatsioonide puhul vähenes Mfd defektsetes rakkudes mutatsioonisagedus aga üksnes UvrA2 puudumisel. Seega mõjutab Mfd olemasolu või puudumine NER-valkudest sõltuva mutageense raja toimumist erinevalt. Siinkohal on oluline märkida, et Mfd ja NER valkude koostoime selgitamine bakteris *P. putida* kirjeldatud mutatsiooniprotsessides muutub veelgi keerukamaks, kui võrrelda nende valkude puudumisest põhjustatud efekte mutatsioonisagedusele plasmidse ja kromosomaalse testsüsteemi puhul. Mida aga saadud tulemuste põhjal võib kindlasti väita, on see, et Mfd-l on mõju NER valkude osalusele mutatsiooniprotsessides ning Mfd mõju on plasmidse ja kromosomaalse testsüsteemi puhul erinev. Ilmselt on bakteris *P. putida* lisaks NER-ile veel DNA reparatsiooniaradu, milles osalevad ka Mfd ja erinevad NER valgud.

Kirjandusest on teada, et NER osaleb UV-kiirgusest ja oksüdatiivsete ning alküüleerivate ühendite poolt põhjustatud kahjustuste parandamises. Huvitaval kombel ei näinud me Mfd puudumisel mõju rakkude kasvule võrreldes algse tüvega alküülkahjustusi põhjustava kemikaali MMS puhul, kuid kui lisaks Mfd-le oli puudu ka kas UvrA või UvrB, oli rakkude elumus võrreldes algse tüvega tunduvalt madalam. Bakteris *Salmonella enterica* on samuti nähtud, et Mfd defektsete bakterite tundlikkus MMS-ile suureneb siis, kui on puudu ka NER valk UvrA (Alvarez jt., 2010). Siit võiks järeldada, et TC-NER ei osale aktiivselt alküülkahjustuste parandamises, kuid samas on nende kahjustuste parandamises oluline roll globaalsel NER-il. Nitrokinoliin ei vähendanud meie katsetes samuti Mfd defektsete rakkude ellujäämist, kuid UvrA ja UvrB ning UvrAUvrA2 puudumisel langes bakterite elumus mitmeid suurusjärke. Ka antud juhul võis Uvr valkude defektsusest põhjustatud globaalse NER-i puudumine olla rakkudele letaalne. Mfd puudumisest põhjustatud mõju rakkude kasvule ilmnes oksüdatiivseid kahjustusi põhjustava kemikaali paraquaadi puhul, kus nii Mfd defektsel tüvel ja ka Mfd ning UvrB topeltdefektsel tüvel oli elumus umbes kümme korda langenud, mis viitab sellele, et paraquaadist põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel võiks osaleda TC-NER. Meie katsetulemused viitavad sellele, et TC-NER võiks osaleda ka mitomütsiin C poolt põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel, kuid mitte nii aktiivselt kui globaalne NER, kuna võrreldes Mfd puudumisega oli topeltmutantide tundlikkus antud kemikaalile suurenenud. Kuigi nii nitrokinoliini kui ka paraquaadi toimel võivad DNA-s tekkida oksüdatiivsed kahjustused, reageerib nitrokinoliinist tekkinud metaboliit Ac-4HAQO ka otse guaniini ja adenosiiniga, põhjustades aluste asendusmutatsioone (Bailleul jt., 1989). See võiks olla ka põhjuseks, miks paraquaad ja nitrokinoliin mõjutasid meie poolt uuritud tüvede ellujäämist erinevalt.

Kokkuvõte

Bakterites toimuvad pidevalt replisoomi ja transkriptsioonikompleksi kokkupõrked. Nii sama- kui vastassuunaline kokkupõrge avaldavad replikatsioonikahvlile mõju, kuid suurem mõju on vastassuunalisel kokkupõrkel, põhjustades isegi rakkude surma. Kokkupõrgete ära hoidmiseks ja nende mõju vähendamiseks on organismides transkriptsiooni reparatsiooniga siduvad faktorid, mis on võimelised eemaldama peatunud RNA polümeraasi, interakteeruma reparatsioonivalkudega ja käivitama vigase koha parandamise. Bakterites on selliseks faktoriks Mfd, mis soodustab RNA elongatsiooni jätkumist ja suunab DNA-l vigasele kohale NER reparatsiooniraja.

Käesoleva töö kirjanduse osas kirjeldasin bakteri kromosoomi kokku pakkimist, kromosoomi replikatsiooni ja transkriptsiooni mõju replikatsioonile. Lisaks andsin ülevaate transkriptsiooniga seotud nukleotiidide väljalõike reparatsioonist (TC-NER) ja seda vahendavast valgust Mfd.

Töö eksperimentaalses osas uurisin, kas bakteris *P. putida* on testgeeni mutatsioonisagedus mõjutatud selle geeni transkriptsioonitaseme tõstmisest ja kuidas mõjutavad replikatsiooni ning transkriptsiooni samasuunaline ja vastassuunaline kokkupõrge mutatsioonisagedust. Lisaks uurisin Mfd osalust *P. putida* kasvavates ja statsionaarse faasi rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides ning Mfd ja NER-i ensüümide koosmõjusid nendes protsessides.

Käesoleva uurimustöö tulemused saab kokku võtta järgmiselt:

- 1) Testgeeni transkriptsioonitaseme suurendamisel suureneb ka selles geenis mutatsioonisagedus ning transkriptsiooni ja replikatsiooni vastassuunalisuse puhul on transkriptsiooni mõju mutatsioonisagedusele suurem võrreldes sellega, kui mõlemad protsessid toimuvad samas suunas (juba avaldatud andmed Juurik jt., 2012, lisa 3).
- 2) *mfd* geeni deleteerimine suurendas raaminihkemutatsioone detekteeriva testsüsteemi puhul mutatsioonisagedust *P. putida* kasvavates rakkudes sõltumata sellest, kas testgeeni *pheA* transkriptsioonitaset oli suurendatud või mitte. Neist tulemustest järeldame, et Mfd olemasolu bakteris *P. putida* vähendab eksponentsiaalse faasi rakkudes raaminihkemutatsioonide tekkesagedust bakteri kromosoomis.

- 3) *mfd* geeni puudumine ei mõjuta plasmiidse asendusmutatsioone detekteeriva testsüsteemi puhul sihtmärkgeeni mutatsioonisagedust ei kasvavates ega statsionaarse faasi rakkudes.
- 4) TC-NER ei osale eelnevalt meie töörühmas nähtud NER-i mutageensuses, kuid Mfd-1 on mõju NER valkude osalusele mutatsiooniprotsessides ning see mõju on plasmiidse ja kromosomaalsete testsüsteemide puhul erinev.
- 5) Erinevate DNA-d kahjustavate kemikaalide poolt põhjustatavate vigade parandamises osaleb eeskätt globaalne NER ning Mfd vahendatav TC-NER osalus ilmneb vähesel määral üksnes osade kemikaalide puhul.

Influence of transcription and transcription coupled DNA repair on mutational processes in bacterium *Pseudomonas putida*

Kärt Ukkivi

Resume

In bacteria replication and transcription proceed simultaneously with the difference that the speed of the DNA polymerase progression is 12-30 times faster than the elongation rate of RNA polymerase. Therefore collisions between the two polymerases seem unavoidable. It is shown that co-directional collisions influence replication fork less than head-on collisions, that are thought to induce mutation frequency. Mutation frequency is also thought to be induced by elevated level of transcription. To avoid collisions or to reduce their effect, organisms have transcription repair coupling factors that are able to remove stopped RNA polymerases, interact with DNA repair proteins and activate repair of the damaged site. In bacteria that factor is Mfd. Mfd is a widely conserved bacterial protein that connects the cellular processes of transcription and DNA repair. If RNA polymerase has stopped and reverse translocated on DNA, Mfd induces its forward translocation and RNA elongation activity. In the case of a DNA lesion Mfd removes RNA polymerase and its transcript from the DNA and recruits the nucleotide excision repair (NER) machinery by interacting with UvrA. Although Mfd is active in DNA repair, it has also been shown in some bacteria to have function in promoting mutation frequencies.

In the literature review of this study I described compaction of the bacterial chromosome, its replication and the influence of transcription on replication. I also described transcription coupled nucleotide excision repair (TC-NER) and Mfd function in transcription coupled repair (TCR).

In the experimental part of this study I investigated whether the frequency of mutation in the test gene is influenced by elevation of transcription level of this gene in *P. putida* and how is the mutation frequency influenced by co-directional and head-on collisions of replication and transcription. Participation of Mfd in *P. putida* mutational processes in growing and stationary phase bacteria and co-influence of Mfd and NER enzymes in those processes was also investigated.

The results of my study can be summarized as follows:

- 1) Elevated level of transcription of the mutational target gene facilitates the frequency of mutations in growing bacteria and head-on collisions of replisome and transcription

complexes influence mutation frequency more than co-directional collisions (published data Juurik jt., 2012, appendix 3).

2) Deletion of *mfd* gene caused elevation of mutation frequency on frameshift detecting assay in growing *P. putida* cells, despite the level of transcription of mutational target gene *pheA* was elevated or not. From this we can conclude that the presence of Mfd reduces the frequency of frameshift mutations in the chromosome of *P. putida*.

3) The absence of *mfd* gene does not affect the frequency of base substitutions neither in growing nor in stationary phase bacteria when the test gene locates on the plasmid.

4) TC-NER does not contribute to the mutation frequency elevation by NER enzymes observed in our laboratory before. However Mfd influences participation of NER enzymes in mutational processes and that influence is different when using plasmidial and chromosomal test systems.

5) DNA lesions caused by different chemicals are mostly repaired by global NER, whereas minor contribution of Mfd-dependent TC-NER appears only in the case of certain chemicals.

Tänuõnad

Suur aitäh minu juhendajale Maia Kivisaarele heade ideede ja soovitude eest töö valmimisel ning võimaluse eest tutvuda lähemalt põneva geneetika maailmaga. Minu eriline tänu Rihole mitmekülgse abi ja uute teadmiste eest. Lisaks tänan kõiki meie teadureid, doktorante ja kaasmagistreid, kes ulatasid alati oma abikäe, aitasid heade nõuannetega ning olid tihti pikkadel õhtutel meeldivateks jutukaaslasteks. Viimasena tänaksin ka oma noormeest, sõpru ja perekonda minu ära kuulamise ja motivatsiooni eest.

Kasutatud kirjandus

- Adams, M. H. (1959).** Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. N. Y. p. 445-447.
- Alvarez, G., Campoy, S., Spricigo, D. A., Teixidó, L., Cortés, P., Barbé, J. (2010).** Relevance of DNA alkylation damage repair systems in *Salmonella enterica* virulence. J Bacteriol. 192(7): 2006-2008.
- Bailleul, B., Daupersies, C., Galiegue-Zouitina, S., Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1989).** Molecular Basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. Jpn J Cancer Res. 80: 691-697.
- Bauchpo, T., Elsdén, S. R. (1960).** The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. Gen. Microbiol. 23(3): 457-469.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., Broda, P. (1977).** Two modes of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol. Gen. Genet. 154(2): 203–204.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., Hanawalt, P. C. (1985).** DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell 40(2): 359–369.
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. Mol. Biol. 41(3): 459-472.
- Bramhill, D., Kornberg, A. (1988).** Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. Cell 52(5): 743-755.
- Broyles, S. S., Pettijohn, D. E. (1986).** Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. Mol. Biol. 187(1): 47-60.
- Burnett, W. N. (1981).** “Western Blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112(2): 195-203.
- Carr, K. M., Kaguni, J. M. (2001).** Stoichiometry of DnaA and DnaB protein in initiation at the *Escherichia coli* chromosomal origin. J Biol. Chem. 276(48): 44919-44925.
- Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J., Bioteux, S. (1995).** HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-stranded breaks or gaps. J. Biol. Chem. 270(17): 10291-10296.
- Choi, K.H., Kumar, A., Jschweizer, H. P. (2006).** A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. Microbiol. Methods 64(3): 391-397.

- Claret, L., Rouviere-Yaniv, J. (1997).** Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterotimer is required for long term survival. *Mol. Biol.* 273(1): 93-104.
- Dame, R. T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., Goosen, N. (2002).** Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol. Chem.* 277(3): 2146-2150.
- Deaconescu, A. M., Chambers, A. L., Smith, A. J., Nickels, B. E., Hochschild, A., Savery, N. J., Darst, S. A. (2006).** Structural Basis for Bacterial Transcription-Coupled DNA Repair. *Cell* 124(3): 507-520.
- Dorman, C. J. (2004).** H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(5): 391-400.
- Drlica, K. (1992).** Control of bacterial supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6(4):425-433.
- Esnault, E., Valens, M., Espeli, O., Boccard, F. (2007).** Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 3(12): e226, doi:10.1371/journal.pgen.0030226.
- Fang, L. H., Davey, M. J., O'Donnell, M. (1999).** Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol. Cell* 4(4): 541-553.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4): 1648-1652.
- Ganesan, A., Spivak, G., Hanawalt, P. C. (2012).** Transcription-Coupled DNA Repair in Prokaryotes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 110:25-40.
- Guy, L., Roten, C. A. (2004).** Genometric analyses of the organization of circular chromosomes: a universal pressure determines the direction of ribosomal RNA genes transcription relative to chromosome replication. *Gene* 340(1): 45-52.
- Han, J., Sahin, O., Barton, Y.-W., Zhang, Q. (2008).** Key Role of Mfd in the Development of Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni*. *PloS Pathog.* 4(6): e1000083. doi:10.1371/journal.ppat.1000083.
- Herrero, M. V., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for the cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172(11): 6557–6567.
- Jaffar Ali, B. M., Amit, R., Braslavsky, I., Oppenheim A. B., Gileado, O., Stavans, J. (2001).** Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(19): 10658-10663.

- Johnson, A., O'Donnell, M. (2005).** Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 283-315.
- Juurik, T., Ilves, H., Teras, R., Ilmjärv, T., Tavita, K., Ukkivi, K., Teppo, A., Mikkil, K., Kivisaar, M. (2012).** Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* 7(10): e48511. doi:10.1371/journal.pone.0048511.
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., Sekimizu, K. (1998).** The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94(1): 61-71.
- Katayama, T., Sekimizu, K. (1999).** Inactivation of *Escherichia coli* DnaA protein by DNA polymerase III and negative regulations for initiation of chromosomal replication. *Biochimie* 81(8-9): 835-840.
- Kelman, Z., O'Donnell, M. (1995).** DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 171-200.
- Klapacz, H., Bhagwat, A. S. (2002).** Transcription-Dependent Increase in Multiple Classes of Base Substitution Mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184(24): 6866-6872.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lin, D. C., Levin, P. A., Grossman, A. D. (1997).** Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9): 4721-4726.
- Maisnier-Patin, S., Nordstrom, K., Dasgupta, S. (2001).** Replication arrest during a single round of replication of the *Escherichia coli* chromosome in the absence of DnaC activity. *Mol. Microbiol.* 42(5): 1371-1382.
- Manelyte, L., Kim, Y.-I. T., Smith, A. J., Smith, R. M., Savery, N. J. (2010).** Regulation and Rate Enhancement during Transcription-Coupled DNA Repair. *Mol. Cell* 40(5): 714-724.
- Martinez-Garcia, E., de Lorenzo, V. (2011).** Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13(10): 2702-2716.
- McHenry, C. S., Crow, W. (1979).** DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits. *J. Biol. Chem.* 254(5): 1748-1753.
- Mellon, I., Hanawalt, P. C. (1989).** Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342(6245): 95-98.
- Messer, W. (2002).** The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(4): 355-374.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Press, N.Y.

- Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mirkin, E. V., Mirkin, S. M. (2005).** Mechanism of Transcription-Replication Collisions in Bacteria. *Mol. Cell. Biol.* 25(3): 888-895.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Darst, S. A. (2002).** Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296(5571): 1280-1284.
- Murphy, M. N., Gong, P., Ralto, K., Manelyte, L., Savery, N. J., Theis, K. (2009).** An N-terminal clamp restrains the motor domains of the bacterial transcription-repair coupling factor Mfd. *Nucleic Acids Res.* 37(18): 6042–6053.
- Niki, H., Yamaichi, Y., Hiraga, S. (2000).** Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 14(2): 212–223.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A. (1997).** The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* 89(1): 33-41.
- O'Donnell, M. (2006).** Replisome Architecture and Dynamics in *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* 281(16): 10653-10656.
- Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S., Johnson, R.C. (1996).** Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *Mol. Biol.* 264(4): 675-695.
- Park, J.-S., Marr, M. T., Roberts, J. W. (2002).** *E. coli* Transcription Repair Coupling Factor (Mfd Protein) Rescues Arrested Complexes by Promoting Forward Translocation. *Cell* 19(6): 757-767.
- Park, C., Qian, W., Zhang, J. (2012).** Genomic evidence for elevated mutation rates in highly expressed genes. *EMBO Reports* 13(12): 1123-1129.
- Paul, S., Million-Weaver, S., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Merrikh, H. (2013).** Accelerated gene evolution through replication-transcription conflicts. *Nature* 512(495): 512-515.
- Pomerantz, R. T., O'Donnell, M. (2008).** The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. *Nature* 456(7723): 762-766.
- Pomerantz, R. T., O'Donnell, M. (2010a).** Direct Restart of Replication Fork Stalled by a Head-On RNA Polymerase. *Science* 327(5965): 590-592.
- Pomerantz, R. T., O'Donnell, M. (2010b).** What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* 9(13): 2537-2543.

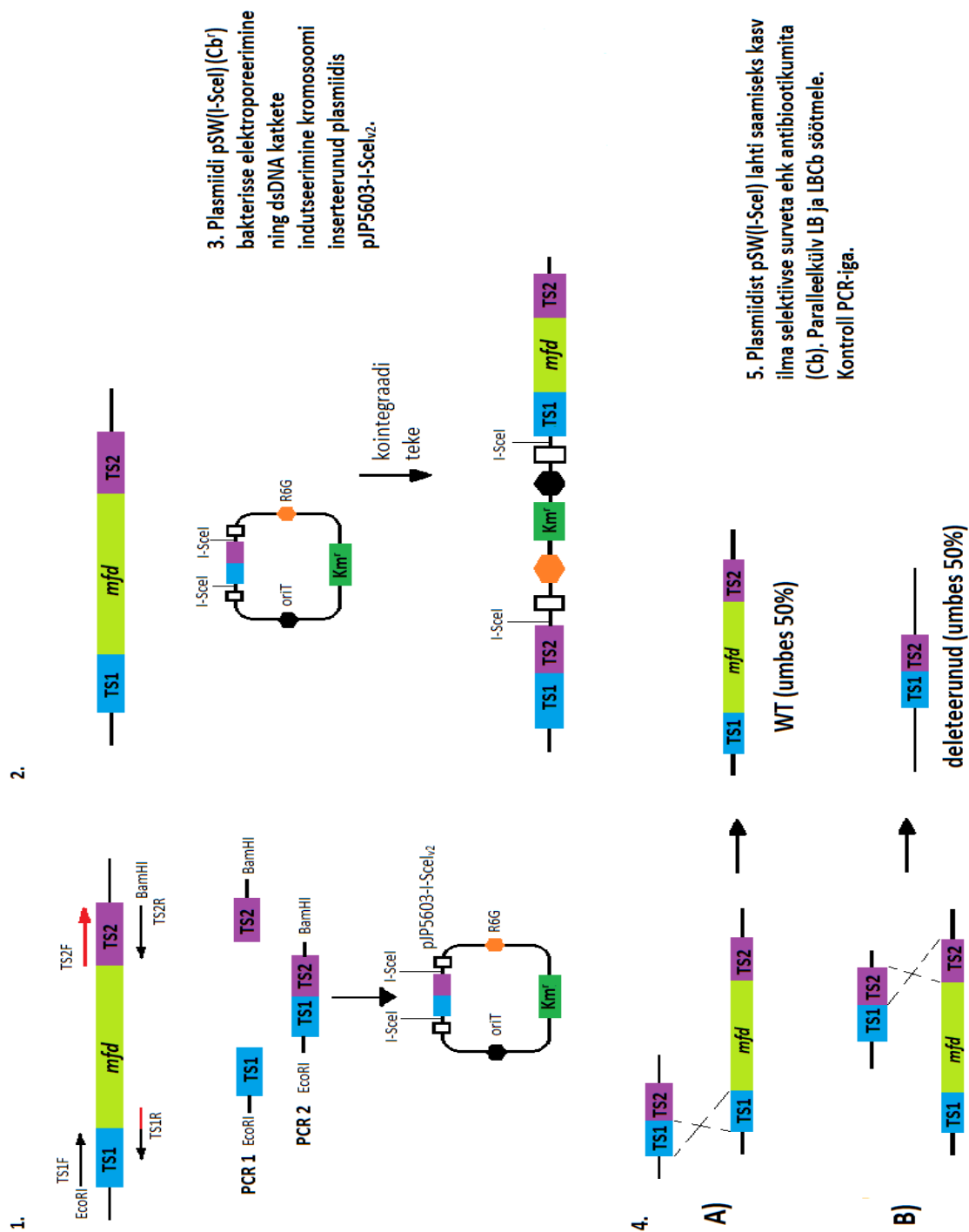
- Posfai, G., Kolisnychenko, V., Berczki, Z., Blattner, F. R. (1999).** Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 27(22): 4409-4415.
- Reyes-Lamothe, R., Wang, X., Sherratt, D. (2008).** *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol.* 16(5): 238-245.
- Rice, P. A., Yang, S., Mizuuchi, K., Nash, H. A. (1996).** Crystal structure and IHF-DNA complex: a protein-induced u-turn. *Cell* 87(7): 1295-1306.
- Rimsky S. (2004).** Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(2): 109-114.
- Ross, C., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H.-M., Yasbin, R. E., Robleto, E. (2006).** Novel Role of *mfd*: Effects on Stationary-Phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 188(21): 7512-7520.
- Rudolph, C. J., Dhillon, P., Moore, T., Lloyd, R. G. (2007).** Avoiding and resolving conflicts between DNA replication and transcription. *DNA Repair (Amst)* 6(7): 981–993.
- Sagi, D., Friedman, N., Vorgias, C., Oppenheim, A. B., Stavans, J. (2004).** Modulation of DNA Conformations Through the Formation of Alternative High-order HU–DNA Complexes. *Mol. Biol.* 34(2): 419-28.
- Sanchez-Romero, J. M., Diaz-Orejas, R., de Lorenzo, V. (1998).** Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulation of *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 4040-4046.
- Savery, N. J. (2007).** The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends in Microbiol.* 15(7): 326-333.
- Schalow, B. J., Courcelle, C. T., Courcelle, J. (2012).** Mfd Is Required for Rapid Recovery of Transcription following UV-Induced DNA Damage but Not Oxidative DNA Damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 194(10): 2637-2645.
- Schägger, H. (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1(1): 16-22.
- Selby, C. P., Sancar, A. (1993).** Molecular mechanisms of transcription-repair coupling. *Science* 260(5104): 53-58.
- Sharma, R. C., Schimke, R. T. (1996).** Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotech.* 20(1): 42-44.
- Srivatsan, A., Tehranchi, A., MacAlpine D. M., Wang, J. D. (2010).** Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet.* 6(1): e1000810, doi:10.1371/journal.pgen.1000810.
- Stavans, J., Oppenheim, A. (2006).** DNA-protein interactions and bacterial chromosome architecture. *Phys. Biol.* 3(4): R1-10.

- Studwell-Vaughan, P. S., O'Donnell, M. (1993).** DNA polymerase accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*. J Biol. Chem. 268(16): 11785-11791.
- Svejstrup, J. Q. (2002).** Transcription Repair Coupling Factor: A Very Pushy Enzyme. Mol. Cell 9(6): 1151-1152.
- Taft-Benz, S. A., Schaaper, R. M. (2004).** The theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase II: a role in stabilizing the epsilon proofreading subunit. J Bacteriol. 186(9): 2774-2780.
- Tark, M., Tover, A., Koorits, L., Tegova, R., Kivisaar, M. (2008).** Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*. DNA Repair 7(1): 20-30.
- Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M., Kivisaar, M. (2004).** Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol. 186(9): 2735-2744.
- Thanbichler, M., Wang, S. C., & Shapiro, L. (2005).** The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. Cell Biochem. 96 (3): 506-521.
- Trun, N. J., & Marko, J. F. (1998).** Architecture of a bacterial chromosome (review). ASM News 64(5): 276-283.
- Turner, J., Hingorani, M. M., Kelman, Z., O'Donnell, M. (1999).** The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. EMBO J. 18(3): 771-83.
- Uptain, S. M., Kane, C. M., Chamberlin, M. J. (1997).** Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. Annu. Rev. Biochem. 66: 117-172.
- Vilette, D., Ehrlich, S. D., Michel, B. (1996).** Transcription-induced deletions in plasmid vectors: M13 DNA replication as a source of instability. Mol. Gen. Genet. 25(4)2: 398-403.
- Wahle, E., Lasken, R. S., Kornberg, A. (1989).** The dnaB-dnaC replication protein complex of *Escherichia coli*. I. Formation and properties. J. Biol. Chem. 264(5): 2463-2468.
- Wang, X., Montero Llopis, P., Rudner, D. Z. (2013).** Organization and segregation of bacterial chromosomes. Nat. Rev. Genet. 14(3): 191-203.
- Westblade, L. F., Campell, E. A., Pukhrambam, C., Padova, J. C., Nickels, B. E., Lamour, V., Darst, S. A. (2010).** Structural basis for the bacterial transcription-repair coupling factor/RNA polymerase interaction. Nucleic. Acids. Res. 38(22): 8357-8369.
- Wong, S. M., Mekalanos, J. J. (2000).** Genetic Footprinting with *mariner*-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(18): 10191-10196.
- Wu, L. J., Errington, J. (2002).** A large dispersed chromosomal region required for chromosome segregation in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. EMBO J. 21(15): 4001-4011.

Kasutatud veebiaadressid:

* <http://tinyurl.com/c4rcb6n>

Lisa 1. *mfd* deleteerimise joonis Podfai jt. (1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud me



Lisa 2. P_{tac} -*pheA*+C testsüsteemi sisaldavate tüvede keskmised Phe^+ mutantide arvud 1×10^7 raku kohta ning 95% usalduspiirid.

Tüvi	Ette kasvatatud IPTG-ga või ilma	Kasv minimaalsöötmel IPTG-ga või ilma	Keskmine kolooniate arv 1×10^7 raku kohta	95% usalduspiir
Ptac-pheA+C_2	0	0	5,44	1,32
Ptac-pheA+C_2	1	0	13,85	2,11
Ptac-pheA+C_13	0	0	6,08	1,85
Ptac-pheA+C_13	1	0	12,06	4,52
Ptac-pheA+C_3	0	0	10,66	2,78
Ptac-pheA+C_3	1	0	27,97	4,48
Ptac-pheA+C_4	0	0	3,67	0,98
Ptac-pheA+C_4	1	0	16,50	2,07
Ptac-pheA+C_2	0	1	10,52	2,03
Ptac-pheA+C_2	1	1	16,03	3,30
Ptac-pheA+C_13	0	1	14,77	3,22
Ptac-pheA+C_13	1	1	18,86	2,93
Ptac-pheA+C_3	0	1	26,58	4,10
Ptac-pheA+C_3	1	1	27,73	3,87
Ptac-pheA+C_4	0	1	11,24	1,40
Ptac-pheA+C_4	1	1	19,35	2,59
Ptac-pheA+C Δ mfd_2	0	1	20,69	3,33
Ptac-pheA+C Δ mfd_2	1	1	31,04	5,21
Ptac-pheA+C Δ mfd_13	0	1	37,90	5,70
Ptac-pheA+C Δ mfd_13	1	1	32,80	3,27
Ptac-pheA+C Δ mfd_3	0	1	31,80	4,71
Ptac-pheA+C Δ mfd_3	1	1	39,61	7,48
Ptac-pheA+C Δ mfd_4	0	1	25,52	3,68
Ptac-pheA+C Δ mfd_4	1	1	31,80	4,25
Ptac-pheA+C Δ mfd _{uvrA}	0	1	33,45	7,25
Ptac-pheA+C Δ mfd _{uvrA}	1	1	33,45	6,85
Ptac-pheA+C Δ mfd _{uvrA2}	0	1	17,25	2,54

Ptac- pheA+CΔmfduvrA2	1	1	30,88	6,22
Ptac- pheA+CΔmfduvrA2A	0	1	17,13	5,11
Ptac- pheA+CΔmfduvrA2A	1	1	14,42	2,91
Ptac- pheA+CΔmfduvrB	0	1	21,66	5,14
Ptac- pheA+CΔmfduvrB	1	1	28,72	6,18

Lisa 3. Publikatsioon

Mutation Frequency and Spectrum of Mutations Vary at Different Chromosomal Positions of *Pseudomonas putida*

Triinu Juurik, Heili Ilves, Riho Teras, Tanel Ilmjärv, Kairi Tavita, Kärt Ukkivi, Annika Teppo, Katren Mikkel, Maia Kivisaar*

Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, Tartu University and Estonian Biocentre, Tartu, Estonia

Abstract

It is still an open question whether mutation rate can vary across the bacterial chromosome. In this study, the occurrence of mutations within the same mutational target sequences at different chromosomal locations of *Pseudomonas putida* was monitored. For that purpose we constructed two mutation detection systems, one for monitoring the occurrence of a broad spectrum of mutations and transposition of IS element IS1411 inactivating LacI repressor, and another for detecting 1-bp deletions. Our results revealed that both the mutation frequency and the spectrum of mutations vary at different chromosomal positions. We observed higher mutation frequencies when the direction of transcription of the mutational target gene was opposite to the direction of replisome movement in the chromosome and *vice versa*, lower mutation frequency was accompanied with co-directional transcription and replication. Additionally, asymmetry of frameshift mutagenesis at homopolymeric and repetitive sequences during the leading and lagging-strand replication was found. The transposition frequency of IS1411 was also affected by the chromosomal location of the target site, which implies that regional differences in chromosomal topology may influence transposition of this mobile element. The occurrence of mutations in the *P. putida* chromosome was investigated both in growing and in stationary-phase bacteria. We found that the appearance of certain mutational hot spots is strongly affected by the chromosomal location of the mutational target sequence especially in growing bacteria. Also, artificial increasing transcription of the mutational target gene elevated the frequency of mutations in growing bacteria.

Citation: Juurik T, Ilves H, Teras R, Ilmjärv T, Tavita K, et al. (2012) Mutation Frequency and Spectrum of Mutations Vary at Different Chromosomal Positions of *Pseudomonas putida*. PLoS ONE 7(10): e48511. doi:10.1371/journal.pone.0048511

Editor: John R. Battista, Louisiana State University and A & M College, United States of America

Received: May 10, 2012; **Accepted:** September 25, 2012; **Published:** October 31, 2012

Copyright: © 2012 Juurik et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Estonian Science Foundation grants 7376 (MK), 7019 (RT) and 7458 (HI), by funding of Targeted Financing Project SF0180031s08 to MK from Estonian Ministry of Research and Education, and by grant #55005614 to MK from the Howard Hughes Medical Institute International Research Scholars Program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: maia.kivisaar@ut.ee

Introduction

Mutations provide a raw material for population diversity and adaptation; therefore the mutation rate has profound effects on population diversity and evolution dynamics. Mutagenesis is a complex multi-step process involving DNA target sequences and enzymes that play roles in DNA precursor metabolism, DNA replication, recombination and repair [1]. To elucidate molecular mechanisms of mutagenesis, it is necessary to develop systems that enable detection and analysis of mutations in living cells. Hence, over the years, a number of detection systems have been developed to study mutagenesis in bacteria [2]. Some of these mutation detection systems allow to monitor mutations in plasmids whereas others in bacterial chromosome.

Occurrence of mutations in plasmids and a chromosome may differ due to distinct replication mechanisms and higher copy number of plasmids in comparison to the chromosome. For instance, ColE1 plasmids do not replicate in the same manner as the *E. coli* chromosome [3]. Also, expression of plasmid conjugal functions may facilitate mutagenic processes, as it happens in the case of the occurrence of Lac⁺ revertants on F⁺ plasmid in *E. coli* FC40 strain [4,5,6]. On the other hand, when studying mutagenic

processes in the bacterial chromosome, one should also consider various factors affecting DNA replication and thereby mutagenesis. A growing body of evidence have accumulated over the last years showing that replication inhibition by natural impediments such as DNA binding proteins, transcription units, unusual DNA structures and replication slow zones causes genomic instability [7]. Several other studies have addressed the effects of asymmetry of DNA replication on mutation rate [e. g., reviewed in [8]]. One DNA strand (the leading strand) is synthesized continuously, whereas the complementary strand (the lagging strand) is synthesized discontinuously in short Okazaki fragments. It has been suggested that different enzymology within the replication of two strands could provide a basis for different fidelity. For example, measurement of *lac* reversion frequencies for the two orientations in the chromosome of *E. coli* in the absence of DNA mismatch repair indicated that the lagging strand replication may be more accurate than leading strand replication [9,10]. Yet, the results of subsequent studies have been contradictory. Under the conditions of constitutive expression of the SOS system the replication of the lagging strand appeared to be the major source

of the mutations [11], whereas the following studies demonstrated lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *E. coli* [12].

The effect of chromosomal position on mutation rate has also been addressed in previous studies. Based on the results of comparison of synonymous substitution rates of a set of homologous genes in different bacterial species it was proposed that mutation rate depends on the distance of the target genes from the origin of replication in bacterial chromosome, being higher when genes are situated closer to the terminus [13,14]. However, experimental studies have failed to detect such effect of the distance from the origin of replication on the mutation rates when *lacZ* alleles were inserted at four sites in the *Salmonella* genome [15]. At the same time, the reversion rates of the *lacZ* alleles inserted at an intermediate locus were significantly higher than those at loci nearer to and farther from the replication origin [15]. Recently, Martina et al. [16] demonstrated that frameshift mutation rate differs at distinct chromosomal positions but no correlation between the mutation rate and the distance of the mutation site to the origin of replication was found. In contrary to the above-mentioned studies, no significant mutational bias on the occurrence of base substitutions with regard to chromosome position or leading and lagging strands of replication were found in the two sequenced genomes of 5000 generations evolved *Salmonella typhimurium* under the conditions of reduced selection and in the absence of major DNA repair systems [17]. Also, the recent analysis of the genomes of 20 commensal and pathogenic *E. coli* strains suggests that the higher mutation rates estimated near the terminus could actually be associated with a reduced efficiency of selection due to lower rates of recombination at this region [18]. Thus, some controversy between the results of experimental approaches and the analyses of whole genome DNA sequences still exists and therefore the effect of the chromosome location on the rate of mutations needs further examination.

The growth phase of bacteria may also affect mechanisms of mutagenic processes. In nature, bacteria are very often confronted with variable and stressful environments. Under such conditions bacteria grow very slowly if at all [19,20]. However, despite the reduced amount of DNA replication mutants arise that are able to take over bacterial populations. This process is known as adaptive mutagenesis, stress-induced mutagenesis or stationary-phase mutagenesis [21,22]. It has been suggested that a variety of environmental stresses induce genomic change in bacteria, generating occasional fitter mutants and potentially accelerating the evolution of bacterial populations [21,22,23,24,25,26]. Alternatively, the amplification model proposes that selection detects small improvements in growth due to a higher copy number of the selected gene; in that way mutation is made more likely because more copies of mutation target gene is added to each developing clone [27]. Despite the controversy in interpretations of the rate of mutations in stationary-phase populations the results of several studies have demonstrated that the spectrum of stationary-phase mutations is different from that occurring among the mutants of actively growing bacteria [28,29,30], indicating that distinct mechanisms are responsible for the appearance of mutations in actively growing and stationary-phase populations.

So far, *E. coli* has served as the primary model in virtually all fundamental aspects of microbiology including mutagenesis and evolution. However, recent advances in sequencing and annotation of more than a thousand of bacterial genomes have revealed that *E. coli* is rather exceptional considering its DNA polymerases and DNA repair enzymes [31,32,33,34]. For example, *E. coli* is one of the rare organisms harboring DNA polymerase Pol V genes in its chromosome [32]. At the same time, pseudomonads, one of the largest groups of bacteria including both pathogenic and non-

pathogenic species, possess some DNA polymerases and DNA repair enzymes which are widely represented in many bacteria except enterobacteria [35], thereby serving as a good model to study mutagenic processes in microorganisms distinct from *E. coli*. Unfortunately, a wide array of assay systems applicable for the detection of mutations in enterobacteria (e.g., those which are based on the activation of *lac* alleles) does not work in pseudomonads. Moreover, the test systems which have been available for the detection of mutations both in growing and stationary-phase populations of pseudomonads have enabled to monitor mutations on a plasmid [29,36].

In the present study we have constructed novel chromosomal mutation detection systems for pseudomonads. These test systems can be inserted randomly into various chromosomal sites. Using these test systems in *P. putida* we have investigated: (i) the frequency of mutations at different chromosomal sites; (ii) the effect of orientation of the target gene on mutagenic processes in the bacterial chromosome; (iii) the effect of the growth phase of bacteria on mutagenic processes in the bacterial chromosome. Our results suggest that both the mutation rate and the spectrum of mutations vary at different chromosomal positions. Also, the chromosomal location of the mutational target has a larger effect on the occurrence of mutations in growing bacteria than in stationary-phase bacteria.

Results

Construction of Test Systems Detecting Mutations in the *P. putida* Chromosome

So far, only plasmidial test systems have been available to study the mechanisms of the occurrence of stationary-phase mutations under carbon starvation conditions of *P. putida* and other pseudomonads [29,36]. These test systems have not been applicable for the detection of mutations in the bacterial chromosome because of too low mutation frequency. To overcome these limitations, we constructed two novel, more sensitive assay systems that allow studying mutational processes in *P. putida* chromosome both in growing and stationary-phase bacteria. Mutants able to grow on minimal medium containing phenol as only carbon and energy source (Phe⁺ mutants) can be isolated.

The phe-lacI test system detects different types of mutations either inactivating LacI repressor or abolishing its binding sites at the *lac* operator. In this test system the phenol degradation genes *pheBA* are placed downstream of the P_{tac} promoter, which is negatively controlled by the LacI repressor. Details for the construction of the *lacI*-P_{tac}-*pheBA* gene cluster (the phe-lacI test system) are shown in Materials and Methods and in Table S1. The second test system, pheA+C, was constructed to monitor a single type of Phe⁺ revertants at the fixed position of the gene *pheA*. This novel chromosomal test system is analogous to the plasmidial test system constructed by us earlier to measure reversion of a +1 frameshift mutation at a three C-nucleotides repeat flanking the inserted A nucleotide within the coding sequence of the *pheA* gene [36]. It is known that the frequency of frameshifts within nucleotides repeat is usually proportional to its length [37]. Therefore, to establish higher frequency of mutations than was achieved with the previously constructed plasmidial test system, an additional C nucleotide was introduced into a six C-nucleotides repeat at position 221 relative to the translation initiation codon of the *pheA* sequence. The frameshift mutation-containing *pheA* allele was transcribed from the constitutively expressed P_{gc} promoter. Like the phe-lacI test system, it was inserted into the chromosome with mini-Tn5 (see Materials and Methods and Tables S1 and S2

for the construction of this test system). Initial monitoring of the appearance of Phe⁺ revertants on phenol minimal plates containing 1×10^9 tester cells of *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at distinct sites in the chromosome revealed that this test system is very sensitive for the detection of chromosomal mutations. For instance, on day 6 after the plating of the tester cells thousands of Phe⁺ colonies had emerged onto phenol minimal plates. The occurrence of the 1-bp deletion at the expected site was confirmed by the sequencing of the *pheA* gene in 8 independently isolated Phe⁺ revertants.

The Frequency of Mutations is Affected by the Chromosomal Location and Orientation of the Test System

To explore the occurrence of mutations in different chromosomal locations of *P. putida*, we took 21 randomly selected chromosomal insertions of the phe-lacI test system and 14 random insertions of the pheA+C test system and monitored the accumulation of Phe⁺ mutants in these strains. The chromosomal location of the phe-lacI and pheA+C test systems in individual strains is shown in Fig. 1 and the exact insertion sites of the test system-carrying mini-Tn5 are presented in Tables S3 and S4. We plated about 1×10^7 tester cells together with 1×10^9 scavenger cells onto selective plates containing phenol as an only carbon source and monitored the appearance of Phe⁺ mutant colonies in starving populations during 9 days.

In populations carrying the phe-lacI test system in most cases the first Phe⁺ colonies emerged onto selective plates on day 3 after the plating. Then, there was a 3-days period of rapid emergence of the mutants (Table 1). For days 8 and 9 the rate of the

accumulation of Phe⁺ mutants significantly declined in all strains (the only exception was the strain phe-lacI_8 with the peak on day 8).

The frequency of the accumulation of Phe⁺ mutants onto selective plates differs in the studied strains (Table 1). Based on ANOVA with *post-hoc* Tukey HSD test, the total numbers of Phe⁺ mutants accumulated for day 9 in the strains phe-lacI_30, phe-lacI_16, phe-lacI_25, phe-lacI_117 and phe-lacI_115 were separated to homogeneity group distinct from that for the strains phe-lacI_5, phe-lacI_18, phe-lacI_19 and phe-lacI_20 ($P < 0.05$).

The phe-lacI test system enables detection of a broad spectrum of mutations which may have dissimilar effects on the growth rate of Phe⁺ colonies on phenol minimal plates. This complicates monitoring of dynamics of occurrence of mutations. In contrast, the pheA+C test system detects only a single type of mutations at the specific site, 1-bp deletions restoring the reading frame of the *pheA* gene. Thus, the usage of the pheA+C test system could allow better observation of changes in dynamics of occurrence of mutations in growing and carbon-starved *P. putida*. In general, it took approximately 4–6 days for first Phe⁺ colonies to appear onto selective plates when the *P. putida* strains carrying the pheA+C test system were examined for the accumulation of Phe⁺ mutants (Table 2). However, in the populations of the strain pheA+C_S, the first Phe⁺ mutants appeared on selective plates on day 11. For day 15, in average 5.7 mutants per 1×10^7 viable cells was counted. Also, in average 12.5 mutants per 1×10^7 cells emerged to selective plates during the days 11–15 in the populations of the strain pheA+C_P.

In general, the rate of the accumulation of Phe⁺ colonies declined approximately by one order of magnitude 4–5 days after

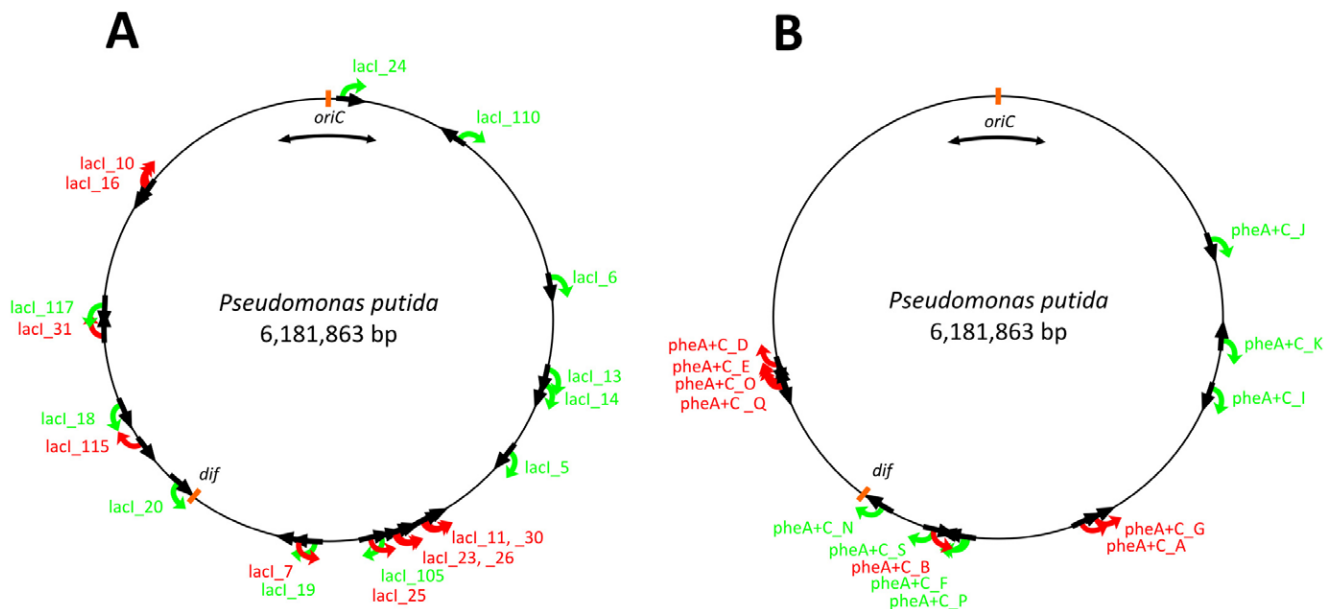


Figure 1. Chromosomal location of the randomly inserted test system in various *P. putida* strains. The locations of the phe-lacI test system detecting only frameshift mutations are shown in panel A (designated as lacI) and the locations of the pheA+C test system detecting only frameshift mutations are shown in panel B. The black arrows demonstrate the direction of transcription of the *P. putida* chromosomal genes containing the insertions of the test system. When the transcribed strand is the leading strand template for replication, the RNA polymerase and the replisome move in the same direction (co-directional orientation); when the transcribed strand is the lagging strand template, the RNA polymerase and the replisome converge (head-on orientations). The direction of transcription of the mutational target genes (the *lacI* gene in the phe-lacI test system and the *pheA* gene in the pheA+C test system) in different *P. putida* strains is indicated by green or red arrows. The red arrows designate head-on orientations of the transcription of the mutational target gene and the movement of the replisome in the chromosome and the green arrows point to co-directional transcription and replication. The replication of the chromosome starts at *oriC* region (indicated by two-directional arrow) and terminates at *dif* sites. Location of *P. putida* *dif* sequence is according to [87].

doi:10.1371/journal.pone.0048511.g001

Table 1. The frequency of accumulation of Phe⁺ mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations^a.

Strains ^b	HG ^c	Days							Total
		3	4	5	6	7	8	9	
phe-lacI_30	(a)	17.12 (19.95)	49.00 (23.10)	35.84 (48.04)	56.28 (24.81)	17.04 (6.28)	8.41 (4.76)	12.67 (15.51)	196.35 (42.25)
phe-lacI_16	(a)	16.07 (9.11)	23.56 (16.90)	22.89 (15.62)	74.67 (48.58)	17.41 (11.51)	15.11 (8.22)	5.85 (4.25)	175.56 (87.76)
phe-lacI_25	(a)	4.49 (4.76)	103.29 (99.11)	11.12 (4.69)	34.80 (15.52)	9.99 (6.30)	3.61 (1.78)	2.50 (2.60)	169.8 (100.75)
phe-lacI_117	(a)	2.75 (1.82)	36.93 (11.39)	43.13 (12.62)	50.97 (12.09)	22.89 (12.37)	4.27 (2.02)	2.44 (0.98)	163.48 (39.64)
phe-lacI_11	(ab)	21.27 (47.43)	35.72 (26.00)	12.10 (10.81)	61.34 (43.82)	19.46 (12.55)	5.83 (2.47)	3.10 (4.25)	158.82 (94.14)
phe-lacI_115	(a)	0.45 (0.57)	63.31 (10.71)	17.78 (4.55)	30.24 (7.17)	17.55 (7.99)	5.32 (1.79)	1.81 (0.87)	136.47 (16.41)
phe-lacI_31	(ab)	10.91 (4.61)	30.25 (15.05)	13.79 (9.50)	49.71 (36.18)	8.98 (4.06)	5.79 (2.35)	5.91 (4.24)	135.23 (62.83)
phe-lacI_26	(ab)	14.92 (23.93)	43.02 (27.66)	13.83 (4.95)	36.41 (10.36)	11.03 (4.96)	2.37 (1.68)	6.69 (5.72)	128.27 (67.26)
phe-lacI_12	(ab)	11.81 (11.26)	18.44 (13.36)	39.89 (33.47)	22.81 (9.43)	6.44 (6.24)	9.37 (6.77)	15.33 (9.35)	124.11 (53.01)
phe-lacI_105	(ab)	0.10 (0.23)	3.60 (3.67)	3.40 (3.62)	7.00 (6.50)	63.90 (10.73)	23.50 (4.39)	12.40 (2.64)	113.90 (18.11)
phe-lacI_110	(ab)	3.10 (1.52)	17.99 (5.10)	13.96 (5.59)	52.95 (12.06)	16.34 (6.11)	3.93 (1.67)	2.48 (1.22)	110.75 (20.45)
phe-lacI_10	(ab)	10.41 (11.25)	19.46 (5.47)	10.76 (3.31)	53.42 (19.79)	7.68 (5.62)	4.07 (1.73)	4.56 (3.41)	110.35 (30.44)
phe-lacI_23	(ab)	5.2 (2.93)	30.08 (9.78)	12.17 (2.68)	31.81 (7.05)	14.41 (5.09)	3.38 (1.36)	4.59 (1.6)	101.88 (18.44)
phe-lacI_14	(ab)	1.41 (1.25)	20.54 (10.65)	12.79 (5.39)	32.31 (21.29)	9.26 (4.92)	5.38 (4.37)	6.10 (2.91)	87.78 (37.81)
phe-lacI_6	(ab)	17.23 (22.02)	17.12 (10.72)	13.96 (7.33)	20.54 (7.69)	4.75 (2.98)	5.51 (5.10)	8.59 (3.90)	87.69 (38.41)
phe-lacI_8	(ab)	0.34 (0.78)	9.47 (9.11)	14.38 (12.49)	13.29 (12.05)	6.43 (5.25)	34.70 (35.18)	4.10 (3.27)	82.71 (35.19)
phe-lacI_7	(ab)	0.74 (1.71)	23.65 (19.75)	12.40 (11.01)	29.62 (26.90)	8.78 (12.91)	2.48 (5.08)	3.33 (4.44)	81.01 (48.28)
phe-lacI_13	(ab)	3.40 (4.56)	20.54 (9.24)	12.51 (7.60)	27.33 (16.47)	4.38 (2.80)	2.91 (1.81)	8.49 (3.82)	79.56 (26.08)
phe-lacI_24	(ab)	4.11 (1.87)	11.45 (4.56)	11.10 (5.83)	22.16 (16.85)	3.70 (3.31)	3.77 (1.56)	15.39 (16.07)	71.67 (21.86)
phe-lacI_1	(ab)	1.73 (2.85)	2.83 (2.23)	4.49 (2.28)	11.83 (4.76)	35.71 (10.04)	3.69 (2.03)	7.87 (4.07)	68.15 (13.76)
phe-lacI_5	(b)	5.23 (8.82)	9.13 (21.06)	12.27 (10.56)	14.69 (9.87)	5.12 (8.29)	3.43 (4.44)	7.34 (8.55)	57.21 (36.17)
phe-lacI_20	(b)	0.37 (0.38)	15.8 (5.60)	9.09 (3.00)	17.92 (4.4)	4.47 (1.00)	3.77 (1.92)	6.08 (2.48)	54.28 (8.73)
phe-lacI_19	(b)	0.24 (0.37)	17.13 (10.34)	6.40 (3.87)	21.21 (11.18)	3.76 (2.89)	1.49 (1.19)	2.08 (1.63)	52.29 (13.56)
phe-lacI_18	(b)	0	6.76 (2.22)	5.93 (1.74)	14.93 (3.02)	4.12 (1.44)	2 (1.06)	4.31 (2.12)	38.05 (5.91)

^aAverage number of Phe⁺ mutants per day and total number of mutants calculated per 1×10^7 cells with 95% confidence intervals are shown. The results with at least 7 (7–28) independent populations of each strain are presented.

^bStrains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold. Note that location of the test system in the chromosome of the strains phe-lacI_1, 8 and 12 has remained unknown.

^cHomogeneity group.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t001

the appearance of first colonies (Table 2). We observed the similar reduction in the emergence of Phe⁺ mutants in comparison to that at initial period also in this case when 10-times smaller amounts of the pheA+C tester cells were plated (data not shown). This indicated that the decline in the rate of accumulation of the 1-bp deletion mutants during the prolonged starvation was not caused by an inhibitory effect of the already existing Phe⁺ colonies on the growth of later appearing mutant colonies. Thus, our results demonstrated that the frameshift mutations occur at higher frequency in the *P. putida* chromosome when bacteria are still growing or have been only for a short time under conditions of carbon starvation. Later, during the prolonged starvation of bacteria the frequency of these mutations is remarkably reduced.

Similarly to the results obtained with the phe-lacI test system, the frequency of the occurrence of mutations detected by the pheA+C test system was influenced by the location of the test system in the chromosome (Table 2). Based on the comparison of the total number of the Phe⁺ mutants accumulated per 1×10^7 cells for the day 9 it is possible to distinguish homogeneity groups with statistically significantly different mutant frequency. The strain pheA+C_B exhibited the highest mutant frequency (group a) and the strains pheA+C_K, pheA+C_J and pheA+C_P exhibited the

lowest frequency of Phe⁺ mutants (group d). As already mentioned above, we detected the fast emergence of Phe⁺ mutants in the strains pheA+C_P and pheA+C_S at later incubation period (on days 11–15). However, the total number of the Phe⁺ mutants accumulated per 1×10^7 for day 20 in the populations of the strains pheA+C_P and pheA+C_S remained statistically significantly lower than that in some other strains (e.g., in the strains pheA+C_B, O, and G) (data not shown).

To explain the differences in the rate of accumulation of Phe⁺ mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI or pheA+C test system at distinct chromosomal sites, we examined the possibility that insertion of the test system into certain sites of the chromosome has altered the expression of genes which may influence mutation frequency in bacteria. However, based on the annotation of *P. putida* KT2440 genes at <http://www.pseudomonas.com> none of the genes which were targeted by the test system in the strains either exhibiting lower or higher Phe⁺ mutant frequency were known to be connected with processes which could affect mutation frequency (Tables S3 and S4). Additionally, to exclude the possibility that the differences observed in the Phe⁺ mutant frequency between individual strains could be a consequence of changes in overall mutation frequency,

Table 2. The frequency of accumulation of Phe⁺ mutants in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at different chromosomal locations^a.

Strains ^b	HG ^c	Days						Total
		4	5	6	7	8	9	
pheA+C_B	(a)	0.34 (0.55)	0.9 (1.13)	4.85 (6.10)	36.25 (27.32)	55.21 (45.51)	6.95 (8.80)	104.5 (81.14)
pheA+C_O	(b)	0	0.24 (0.60)	20.50 (11.87)	6.96 (4.50)	0.24 (0.60)	0	27.93 (15.05)
pheA+C_G	(bc)	0	0	18.58 (8.83)	4.40 (2.96)	0.9 (1.13)	0	23.87 (10.25)
pheA+C_Q	(bc)	0	0	9.03 (7.68)	9.42 (2.38)	1.04 (0.922)	0	19.48 (5.59)
pheA+C_E	(bc)	0	0	6.25 (4.57)	8.24 (4.41)	0.70 (1.24)	0.51 (0.83)	15.71 (7.55)
pheA+C_A	(bc)	0	5.96 (2.93)	8.10 (3.85)	0.53 (0.62)	0.11 (0.27)	0	14.71 (5.2)
pheA+C_D	(bc)	0	0	7.01 (3.65)	3.66 (1.5)	0.29 (0.47)	0	10.96 (3.82)
pheA+C_I	(bc)	0	2.91 (1.07)	7.71 (3.63)	0.21 (0.54)	0	0	10.83 (3.83)
pheA+C_N	(c)	0	0	0	0	8.07 (3.59)	1.71 (1.97)	9.77 (4.38)
pheA+C_F	(cd)	0	0	0	3.98 (2.49)	0.99 (0.90)	0.19 (0.48)	5.16 (3.38)
pheA+C_K	(d)	0	1.89 (1.59)	0.68 (1.17)	0	0	0	2.57 (1.97)
pheA+C_J	(d)	0	0	1.26 (0.94)	0.29 (0.48)	0	0.29 (0.48)	1.85 (1.30)
pheA+C_P	(d)	0	0	0.3 (0.77)	0	0	0	0.3 (0.77)
pheA+C_S	(d)	0	0	0	0	0	0	0

^aAverage numbers of Phe⁺ mutants per day and total number of mutants for day 9 calculated per 1×10^7 cells with 95% confidence intervals are shown. The results with at least 6 independent populations of each strain are presented.

^bStrains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold.

^cBased on the comparison of the frequency of Phe⁺ mutations accumulated for day 9 statistically significantly different ($P < 0.05$) homogeneity groups (a–d) appeared. doi:10.1371/journal.pone.0048511.t002

we compared the frequency of appearance Rif^r mutants in the strains that exhibited statistically significantly higher or lower Phe⁺ mutant frequency than the others. Among the strains carrying the phe-lacI test system, all strains belonging to the homogeneity groups a or b (Tableô 1) were examined. The strains phe-lacI_11 and phe-lacI_31 belonging to the homogeneity group ab were also included to this comparison. The average number of Rif^r mutants per 1×10^9 cells was similar in majority of these strains (Table S5). According to the ANOVA with *post-hoc* Tukey HSD test, statistically significant differences appeared in the frequency of Rif^r mutants only in this case when the strain phe-lacI_117 was compared with the phe-lacI strains 5, 15, 20 and 30 ($P < 0.005$). However, in contrary to the reduced frequency of Rif^r mutants, this strain expressed elevated frequency of Phe⁺ mutants (Tableô 1). The strains phe-lacI_105 and phe-lacI_110 also exhibited slightly reduced frequency of Rif^r mutants in comparison to the strain phe-lacI_16 ($P = 0.047$ and $P = 0.039$, respectively) but these differences could be insignificant since the P -values were close to α level ($\alpha = 0.05$). The frequency of Rif^r mutants measured in the pheA+C test system-carrying strains (Table S6) did not differ statistically significantly or the P -value was close to α level (compare Rif^r mutant frequency in the strains pheA+C_G pheA+C_J, $P = 0.037$). Taken together these results suggested that the differences in the frequency of occurrence of Phe⁺ mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI or pheA+C test system at distinct chromosomal sites are not caused by changes in overall mutation frequency. Rather, the location of the mutational target gene in the bacterial chromosome affects the frequency of occurrence of mutations in this gene.

To elucidate mechanisms which could affect the frequency of mutations at different chromosomal positions, we examined the effect of orientation of the target gene on mutagenic processes in the bacterial chromosome. Indeed, we found that the frequency of mutations was affected by the orientation of the mutational target

gene in the chromosome. The rate of the accumulation of Phe⁺ mutants was higher when the direction of transcription of the mutational target gene (*lacI* in the phe-lacI test system or *pheA* in the pheA+C test system) was opposite to the direction of the synthesis of the leading strand in the bacterial chromosome and *vice versa*, the mutant frequency was lower when the direction of transcription of the target gene and synthesis of the leading strand were co-directional (Fig.ô 1 and Tablesô 1 and 2). At the same time, the frequency of Rif^r mutants was not dependent on the orientation of the mutational target gene of the test system in the chromosome (Tables S5 and S6). We divided the studied strains into two groups according to the direction of transcription of the mutational target gene and movement of replication fork. Group one contained the strains with co-directional transcription and replication and group two the strains with head-on orientations of transcription of the target gene and movement of replisome. By using the Mann-Whitney U test we found that the frequency of Rif^r mutants was similar in the two groups (P values were 0.194 and 0.081 for the phe-lacI and pheA+C strains, respectively). At the same time, the Phe⁺ mutant frequency differed statistically significantly between the two groups for both test systems (P -values were 0.003 and 0.002 for the phe-lacI and pheA+C strains, respectively). Thus, our results indicated that the direction of transcription of the mutational target gene in respect to the replisome movement influences the rate of mutations in the chromosome of *P. putida*.

Artificial Increase of Transcription of the Mutational Target Gene in the *P. putida* Chromosome Elevates Occurrence of Mutations in Growing Bacteria

It has been suggested that the severity of replication fork arrest due to head-on transcription correlates with the level of transcription and may cause mutations especially within highly expressed genes [38,39]. Our results support the idea that head-on

orientations of RNA polymerase and the replisome elevates mutation frequency (Table 1 and 2). In order to evaluate the effect of the level of transcription on mutation frequency in the *P. putida* chromosome, we designed an assay where the transcriptional level of the mutational target gene can be artificially changed. We modified the pheA+C test system by placing the transcription of the *pheA* allele under the control of the LacI repressor and the IPTG-inducible P_{lac} promoter (for details of the construction of the *lacI-P_{lac}-pheA+C* cluster, see Materials and Methods and Table S1). Note that in the absence of IPTG, the *pheA* allele is transcribed in this cluster from the constitutively expressed P_{gc} promoter. Similarly to the other test systems, the obtained P_{lac}-pheA+C test system was inserted into the chromosome of *P. putida* with mini-Tn5. We selected two random insertions of the test system with co-directional orientation of the transcription of the *pheA* allele and the movement of replisome (the strains P_{lac}-pheA+C_2 and P_{lac}-pheA+C_13) and two with head-on orientation (the strains P_{lac}-pheA+C_3 and P_{lac}-pheA+C_4) for the next studies. For exact location of the mini-Tn insertions, see Table S7.

To examine the effect of IPTG on the level of transcription of the *pheA* gene within the constructed *lacI-P_{lac}-pheA+C* cluster, we performed Western blot analysis of the expression of the *pheA*-encoded phenol monooxygenase in cells of Phe⁺ revertant of the strain P_{lac}-pheA+C_2 either grown in the presence or absence of 0.5 mM IPTG. The results presented in Fig. S2 confirmed that the level of expression of the *pheA* gene is elevated when IPTG was added into the growth medium of bacteria. However, the IPTG effects were not detectable in cells of stationary-phase bacteria which were carbon-starved for 3 days (72 hours) on agar plates (Fig. S2). Thus, the constructed test system enabled to examine the effect of artificial increase of transcription of the mutational target gene on mutation frequency in growing cells but not in starving bacteria.

To specify conditions for monitoring the occurrence of Phe⁺ mutants in growing cultures of the tester strains, we examined how long it takes for Phe⁺ mutant colonies to appear onto phenol minimal plates. To mimic the growth conditions used for the selection of Phe⁺ mutants, approximately 100–200 cells of the already existing Phe⁺ mutants were plated onto phenol minimal agar together with 1×10^9 scavenger cells not able to grow on phenol. The Phe⁺ colonies were only barely visible on day 7 and well-detectable on day 8 after the plating.

To study whether the level of transcription of the mutational target gene could affect mutation frequency in *P. putida* growing cultures, we cultivated the tester strains in the presence or absence of IPTG before plating onto selective medium lacking IPTG. The number of Phe⁺ mutants appearing on selective plates on day 8 was compared. Despite the orientation of the mutational target gene *pheA* in the bacterial chromosome, we observed statistically significant increase (*post-hoc* Turkey HSD test) in the number of Phe⁺ mutants emerged on selective plates when bacteria were pre-grown in the presence of IPTG if compared to that when bacteria were grown in the absence of IPTG ($P < 0.001$ for the strains P_{lac}-pheA+C_2, 3 and 4; $P = 0.018$ for the strain P_{lac}-pheA+C_13) (Fig. 2). Thus, the elevated level of transcription of the mutational target gene facilitated the frequency of mutations in growing bacteria.

Spectrum of LacI-inactivating Mutations is Affected by the Chromosomal Location of the Target

Since the frequency of Phe⁺ mutations was altered at distinct chromosomal locations of the target gene, we investigated whether the frequency of occurrence of all mutations was similarly changed

at particular loci or only certain types of mutations were affected. Therefore, we analyzed the spectrum of Phe⁺ mutations isolated in six different phe-lacI strains. Among the studied strains, phe-lacI_18, phe-lacI_105, phe-lacI_110 and phe-lacI_117 contained the mutational target gene *lacI* co-directionally and the strains phe-lacI_31 and phe-lacI_115 opposite to the direction of the replisome movement in the chromosome (Fig. 1A). The strains phe-lacI_115 and phe-lacI_117 expressed higher mutant frequency than several others, whereas the strain phe-lacI_18 exhibited the lowest rate of accumulation of Phe⁺ mutants among all phe-lacI test system-carrying strains characterized in this study (Table 1). We sequenced the *lacI* gene and the *lac* operator region (shown in Fig. 3) in Phe⁺ mutants which accumulated onto selective plates on days 3–7 (Table 3).

We detected various base substitutions and single-nucleotide insertions in the *lac* operator region, and base substitutions, insertions and deletions in the *lacI* repressor gene. CTGG insertions and deletions at position 592 of the *lacI* coding sequence and C-to-T or G-to-A transitions in the *lacI* operator region at the positions –352 and –351 relative to the translation initiation codon of the *lacI* gene in the phe-lacI test system occurred the most frequently. Additionally, we detected insertions of IS element IS1411. IS1411 locates just downstream of the *pheBA* genes in the phe-lacI test system. We have previously shown that insertion of this element in proper orientation upstream of the promoterless *pheBA* genes activates transcription of these genes due to the presence of outward-directed promoters at the left end of IS1411 [40]. In the current study we detected insertions of IS1411 into the *lacI* gene resulting in inactivation of the LacI repressor.

Statistical analysis of the data using the Monte Carlo method devised by Adams and Skopek [41] established that the spectra of mutations identified in the six phe-lacI strains were different from each other (for *P* values, see the results of analysis of total spectrum in Table S8). The most significant differences appeared between the occurrence of CTGG insertions and deletions (indels) at the position 592 of the *lacI* coding sequence (see Ins CTGG and Del CTGG in Table 3 and Table S9). These differences were connected with the orientation of the *lacI* gene in the chromosome. CTGG deletions occurred at this site preferentially in the strains phe-lacI_105, phe-lacI_110, phe-lacI_117 and phe-lacI_18 which carry the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork. CTGG insertions prevailed in the strains phe-lacI_115 and phe-lacI_31 which carry the mutational target gene in the opposite direction. Another mutational hot spot, the G-to-A transitions, was identified in the *lac* operator sequence at the position –351. The appearance of this mutation also varied depending on the chromosomal location of the test system. The –351 G-to-A transitions occurred in 30% cases among all Phe⁺ mutations identified in the strains phe-lacI_18 and phe-lacI_31 but in 12–13% cases in the strains phe-lacI_105 and phe-lacI_117. These differences were statistically significant ($P = 0.001$; Table S9). The proportion of the C-to-T transitions at the position –352 also significantly varied (e.g., compare phe-lacI_31 versus phe-lacI_105 and phe-lacI_117, $P = 0.002$; Table S9). Additionally, certain mutational hotspots appeared merely in one of the studied strains (Table 3). For example, the A nucleotide deletions at the position 221 was specific to the strain phe-lacI_117, the G-to-T transversions at the position 754 were detected only in the strain phe-lacI_105, and 10-nt deletions at the position 300 were characteristic to the strain phe-lacI_18. These differences were also statistically significant ($P < 0.001$). Thus, our results demonstrated that not only the overall frequency of mutations but also the spectrum of mutations is affected by the chromosomal location of the target sequence.

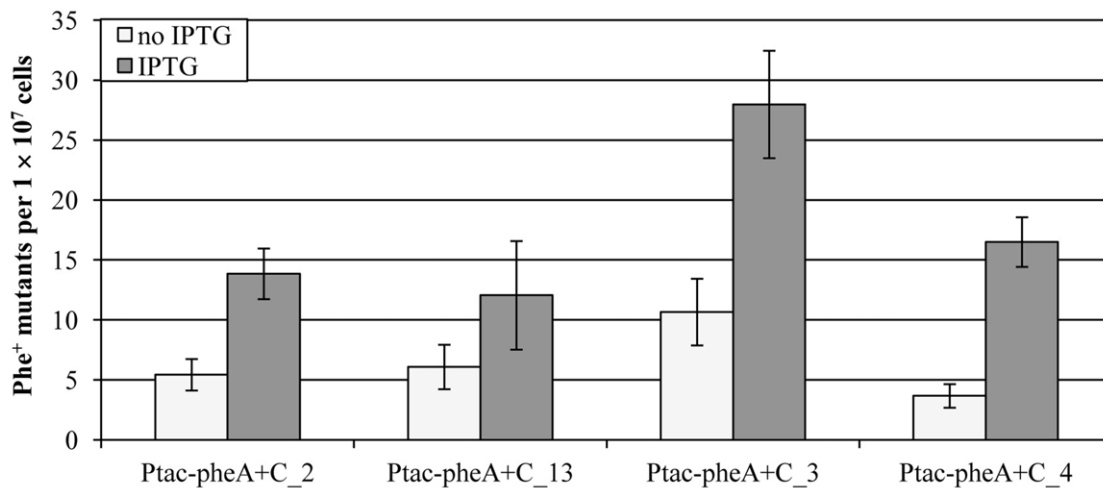


Figure 2. Effect of transcription of mutational target gene on mutation frequency. Influence of transcription was studied in growing bacteria. Average number of Phe⁺ mutants accumulated per 1 × 10⁷ viable cells is shown with 95%-confidence intervals. To compare the frequency of Phe⁺ mutants in growing *P. putida*, bacteria were grown in the presence or absence of 1 mM IPTG and the number of mutants emerged onto phenol minimal plates on day 8 were counted. In total, at least 30 independent cultures were examined in three parallel experiments for each strain. doi:10.1371/journal.pone.0048511.g002

The fact that the CTGG deletions prevailed in the strains which carried the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork and the CTGG insertions appeared preferentially in the strains which carried the mutational target gene in the opposite direction was intriguing. To further confirm, that the orientation of the mutational target gene in the bacterial chromosome could affect the occurrence deletions and insertions, we extended our analysis of the generation of CTGG indels for additional six strains. Three strains used in this experiment carried the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome and expressed the elevated frequency of Phe⁺ mutants (the strains phe-lacI₁₆, phe-lacI₂₅ and phe-lacI₃₀; see Table 1). The other three strains with co-directional transcription of the target gene and movement of replisome expressing the reduced frequency of Phe⁺ mutants (the strains phe-lacI₅, phe-lacI₁₉ and phe-lacI₂₀; Table 1) were also examined for the occurrence of CTGG indels. We found that similarly to the results obtained from our previous experiments (Table 3), the CTGG insertions prevailed in the strains carrying head-on orientation of the mutational target and the movement of the replisome (Table 4). On the other hand, the CTGG deletions prevailed in the strains phe-lacI₁₉ and phe-lacI₂₀ carrying the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork (Table 4). Thus, the results obtained from the extended analysis of the occurrence of CTGG indels confirmed orientation-dependent effects on the generation of deletions or insertions in our assay.

In addition to the differences in the occurrence of point mutations and indels, the frequency of transposition of IS1411 was

affected by the chromosomal location of the target site (Table 3). We detected the insertions of IS1411 into the *lacI* gene only 4 and 2 times in the strains phe-lacI₁₈ and phe-lacI₃₁, respectively, but 8–17 times in the other 4 strains. Statistically significant differences ($P < 0.002$) appeared when the frequency of transposition in the strain phe-lacI₃₁ was compared with that in the phe-lacI strains 105, 110, 115 and 117, and in the strain phe-lacI₁₈ with that in the phe-lacI strains 105, 110 and 117 (Table S6).

Different Types of Phe⁺ Mutations Prevailed in Growing and Stationary-phase Bacteria

As already mentioned above, the DNA sequencing of the Phe⁺ mutants isolated in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system enabled us to identify a wide array of mutations which either inactivated the LacI repressor or abolished its binding site at the operator sequence (Table 3). Since Phe⁺ mutants continued to accumulate onto selective plates during prolonged incubation of bacteria, we supposed that in addition to Phe⁺ mutations that occurred in growing cells, before the plating, several others occurred during the starvation of bacteria on phenol minimal plates. Additionally, time-dependent appearance of the mutants onto selective plates could be caused by dissimilar effects of individual mutations on the level of transcription of the *pheA* gene: Phe⁺ mutants with complete inactivation of the LacI repressor could grow faster on phenol minimal plates than those with partial suppression of its functions. It was also possible that the occurrence of certain mutations is affected by physiological conditions of bacteria, i.e., some mutations arise preferentially in growing bacteria whereas some others in stationary-phase. Therefore, in



Figure 3. The location of the *P_{tac}* promoter and the *LacI* operator sequence in the *phe-lacI* test system. –10 and –35 hexamers of the *P_{tac}* promoter are boxed and the operator sequence is underlined. The nucleotide positions of the operator sequence are given from translational initiator codon GTG of the *lacI* gene. doi:10.1371/journal.pone.0048511.g003

Table 3. Spectrum of Phe⁺ mutations in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at various chromosomal positions.

Position ^b	Mutation	Number of occurrences in different phe-lacI strains ^a					
		105	110	115	117	18	31
–354	Del T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
–353	Del 2 nt (TC)	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
–352	C → T	14 (9.927)	9 (8.381)	6 (6.746)	16 (19.74)	8 (1.951)	3 (2.622)
–352	C → G	2 (1.418)	0	0	0	0	0
–351	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
–351	G → A	13 (9.218)	26 (24.21)	27 (30.36)	16 (19.74)	38 (9.266)	38 (33.21)
–349	T → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
–349	T → C	0	0	2 (2.249)	0	0	0
–348	C → A	0	0	1 (1.124)	0	0	0
–347	A → G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
–347	Ins A	0	1 (0.931)	0	3 (3.702)	0	0
–346	C → T	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
–345	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
–3	Del 288 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
13	A → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
22	Ins 22 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
24	T → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
26	T → C	0	0	0	0	1 (0.244)	0
29	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
37	Del G	0	1 (0.931)	0	0	0	0
44	T → C	0	0	0	0	0	4 (3.495)
49	Del T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
51	Ins A	0	0	0	0	2 (0.488)	0
52	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
53	A → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
53	A → G	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
54	G → T	0	0	1 (1.124)	0	0	0
55	A → G	0	3 (2.794)	0	4 (4.935)	4 (0.975)	0
62	C → T	3 (2.127)	0	0	2 (2.468)	1 (0.244)	0
75	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
89	T → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
96	Ins 2 nt (CG)	0	0	0	2 (2.468)	0	0
100	Ins 10 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
111	Ins 10 nt	1 (0.709)	0	0	0	3 (0.732)	0
131	G → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
140	A → G	0	1 (0.931)	0	0	0	1 (0.874)
141	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
146	C → T	1 (0.709)	0	0	0	1 (0.244)	0
149	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
158	C → A	0	1 (0.931)	0	0	0	0
167	T → A	0	0	0	0	4 (0.975)	0
170	C → T	0	0	1 (1.124)	1 (1.234)	0	0
178	C → T	4 (2.836)	0	0	5 (6.169)	0	0
221	Del A	0	0	0	19 (23.44)	0	0
232	G → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
253	Del T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
253	Del 14 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
291	G → T	2 (1.418)	0	0	0	0	0

Table 3. Cont.

Position ^b	Mutation	Number of occurrences in different phe-lacI strains ^a					
		105	110	115	117	18	31
299	Del 149 nt	0	1 (0.931)	0	0	0	0
300	Del 10 nt	0	0	0	0	7 (1.707)	0
310	Del G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
313	G → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
313	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
391	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
394	Del 66 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
399	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
403	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
405	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
409	Ins G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
457	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
458	Ins C	0	0	1 (1.124)	0	0	0
460	Ins G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
475	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
476	Ins T	1 (0.709)	0	0	2 (2.468)	0	0
479	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
490	Ins A	0	0	0	0	1 (0.244)	0
504	Ins G	0	0	0	0	0	3 (2.622)
541	C → T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
552	Del G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
592	Ins CTGG	3 (2.127)	3 (2.794)	58 (65.21)	1 (1.234)	6 (1.463)	65 (56.8)
592	Del CTGG	18 (12.76)	44 (40.98)	3 (3.373)	18 (22.21)	37 (9.022)	8 (6.991)
603	G → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
653	G → T	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
661	Ins C	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
669	Del G	0	0	0	1 (1.234)	1 (0.244)	0
682	C → T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
705	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
751	C → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
754	G → T	10 (7.091)	0	0	0	0	0
779	Ins 2 nt (CA)	0	0	1 (1.124)	0	0	0
780	C → A	1 (0.709)	0	0	0	0	0
858	A → C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
916	C → T	0	2 (1.863)	0	0	0	0
983	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
IS1411		17 (12.05)	12 (11.18)	8 (8.995)	16 (19.74)	4 (0.975)	2 (1.748)
unknown		3 (2.127)	1 (0.931)	3 (3.373)	5 (6.169)	2 (0.488)	2 (1.748)
Overall mutation frequency		78	104.3	129.3	156.7	31.7	113.6
Total number analyzed		110	112	115	127	130	130

^aFrequency of mutation per site calculated per total number of Phe⁺ mutants accumulated per 1×10⁷ cells for day 7 is shown in parentheses.

^bPositions of nucleotides are given in respect to the *lacI* coding sequence so that the first translated codon GTG is at position 1–3. Mutations at positions –345 to –354 alter the *LacI* operator sequence.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t003

order to investigate whether the growth phase of bacteria could influence the occurrence of mutations in *P. putida* chromosome, we analyzed the spectra of mutations of Phe⁺ mutants that emerged on the selective plates at different periods (on days 3–4, 5, and 6–7).

The spectrum of Phe⁺ mutations after different time periods is shown in Table 5 and Table S10. The most remarkable changes appeared in the occurrence of the CTGG indels at the position 592 of the *lacI* sequence and the –351 G-to-A transitions in the *lac* operator sequence. The CTGG indels prevailed in all strains when

Table 4. Effect of the orientation of mutational target gene in the chromosome on occurrence of CTGG indels in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test systems at various chromosomal positions.

Position	Mutation ^a	phe-lacI strains ^b					
		5	16	19	20	25	30
592	Ins CTGG	32	35	9	10	39	35
592	Del CTGG	6	2	26	15	3	5
Unknown		3	5	11	17	4	6
Total number analysed		41	42	46	42	46	46

^aPhe⁺ mutants accumulated on selective plates on days 3 and 4 were analysed for the occurrence of CTGG indels.

^bStrains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t004

the mutants emerged on days 3–4 were examined (Table 5). In contrary to that, the –351 G-to-A transitions were the most frequent mutations later, on days 6–7 (Table 5). It was possible that the mutations in the LacI repressor operator sequence (e.g., –351 G-to-A transitions) only partially abolished the binding of LacI to the operator. Such mutants could grow slower on phenol minimal plates than those with full inactivation of the *lacI* gene due

to the CTGG indels which changed the reading frame of the *lacI* gene. In order to examine the effects of the CTGG indels and the –351 G-to-A transitions on the growth rate of the Phe⁺ mutants, we performed a reconstruction experiment. About 100–200 cells of the individual Phe⁺ mutants either containing the CTGG indels or the –351 G-to-A transitions were mixed with 1×10^9 *P. putida* scavenger cells that were not able to grow on phenol minimal medium and the mixtures were plated onto phenol minimal plates. The appearance of single Phe⁺ colonies of these mutants, either derived from the strain phe-lacI₁₈ or phe-lacI₃₁, was monitored. The Phe⁺ mutant colonies which contained the CTGG indels appeared onto the phenol-containing minimal plates on day 3 after plating, whereas those which contained the –351 G-to-A transitions in the *lac* operator emerged one day later, on day 4. These results indicated that the appearance of different mutational hot spots among the mutations derived from earlier and later periods of incubation of bacteria on selective plates might be caused by dissimilar effects of these mutations for the growth of Phe⁺ colonies on phenol minimal plates.

Although the growth rate of the Phe⁺ colonies on the phenol minimal plates varied due to dissimilar effects of individual mutations on the transcription of the *pheA* gene from the *P_{lac}* promoter, this was not the only reason that the mutational spectra derived from distinct time periods differed from each other. Whereas in the reconstruction experiments the colonies of the Phe⁺ mutants with the –351 G-to-A transitions at the *lac* operator sequence became visible on selective plates already on day 4 after

Table 5. Time-dependent appearance of mutational hot spots in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system.

Days	Mutation position	pheA-lacI strains					
		105	110	115	117	18	31
3–4	–352 C→T	0	0	0	0	3	0
	–351 G→A	0	0	0	0	0	0
	221 del A	0	0	0	19	0	0
	592 ins CTGG	1	0	34	1	3	42
	592 del CTGG	12	38	2	12	30	4
	754 G→T	8	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	0	3	5	3	0	0
	Total number	26	50	44	50	50	50
5	–352 C→T	0	9	4	11	5	2
	–351 G→A	1	0	0	1	0	0
	221 del A	0	0	0	0	0	0
	592 ins CTGG	0	1	15	0	2	15
	592 del CTGG	4	4	0	3	4	4
	754 G→T	2	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	8	5	1	2	4	2
	Total number	32	25	24	27	30	30
6–7	–352 C→T	14	0	2	5	0	1
	–351 G→A	12	26	27	15	38	38
	221 del A	0	0	0	0	0	0
	592 ins CTGG	2	2	9	0	1	8
	592 del CTGG	2	2	1	3	3	0
	754 G→T	0	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	9	4	2	11	0	0
	Total number	52	37	47	50	50	50

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t005

the plating, these transitions prevailed in the late-appearing Phe⁺ mutants that emerged onto the selective plates later, on days 6–7 (Table 5). This implied that the G-to-A transitions could occur preferentially in populations of starving bacteria, after the plating of tester cells onto phenol minimal plates. In order to further explore whether the occurrence of certain types of mutations could be dependent on physiology of bacteria, we performed statistical analysis of the mutational spectra derived from different time periods and compared these spectra in each strain separately by using the Monte Carlo method. Because the *lac* operator mutations and *lacI*-inactivating mutations had dissimilar effects on the growth of Phe⁺ mutants on selective plates, we omitted the *lac* operator mutations from this analysis and focused only to *lacI* mutations. The Monte Carlo test revealed statistically significant differences in all strains (with the exception of the strain phe-lacI_115) when the spectrum derived from days 3–4 was compared with the spectrum of mutations from day 5 (Table S11). The differences appeared also in this case when the spectrum of mutations from the days 3–4 was compared with that from the days 6–7 in the strains phe-lacI_105 and phe-lacI_117. At the same time, except for the strain phe-lacI_105, no differences appeared when the mutational spectrum from the day 5 was compared with the spectrum from the days 6–7 (Table S11).

Importantly, statistically significant differences appeared also in this case when the spectra of mutations in different strains from the earlier time periods were compared with each other. However, differences were smaller or disappeared when the later periods were compared (Table S8 and S12). Thus, based on this analysis we suggest that more variability in the occurrence of mutations in the *P. putida* chromosome could appear at the stage of active growth of bacteria or when bacteria have spent only short period under the carbon starvation conditions.

The effect of the growth phase of bacteria on the occurrence of certain mutations can be illustrated also by two another DNA sequence alterations which inactivated the *lacI* gene. The A-nucleotide deletion at the position 221, which occurred specifically only in the strain phe-lacI_117, was detected in Phe⁺ colonies that emerged onto selective plates on days 3 and 4 but not later (Table 5 and Table S10). Also, the G-to-T transversions at the position 754, specific to the strain phe-lacI_105, occurred also as the hot spot in the early-arising mutants and were not detected when the later period (days 6–7) was investigated (Table 5 and Table S10). The frequent appearance of these two mutations in the early-arisen Phe⁺ colonies and their absence in the spectrum of mutations at the later periods indicated that these point mutations could occur preferentially in growing bacteria.

Taken together, the results of the analysis of the spectra of mutations from different time periods allowed us to draw two conclusions. First, some mutations in the *P. putida* chromosome occur preferentially in the growing cells and are rare in stationary-phase, whereas certain other mutations (e.g., –351 G-to-A transitions at the *lac* operator) prevail in stationary-phase bacteria. Secondly, the chromosomal location of the mutational target to a larger extent influences the occurrence of mutations in growing cells than in stationary-phase cells.

Discussion

It has been known for many years that the mutation rate can vary dramatically between nucleotide sites [42]. Recent analysis of large genomic data sets of eukaryotic genomes suggests that the mutation rate can vary over many different scales, from the adjacent sites to whole chromosomes [43]. Compared to the complex organization of eukaryotic chromosomes, bacterial

chromosomes are smaller and structurally simpler. It is still an open question whether the mutation rate can vary across the bacterial chromosome. Earlier studies have suggested that the genes farther from the replication origin have higher mutation rates than those nearest to it [13,14]. Examination of the reversion rates of *lacZ* alleles inserted at four positions in the *Salmonella enterica* chromosome [15], however, did not support these findings. Nevertheless, significantly higher mutation frequency at intermediate locus than those inserted closer to replication origin or terminus appeared [15]. In contrast to the above-mentioned studies, recently published analysis of whole genome sequences suggests that there is no significant mutational bias with regard to chromosome position [17,18].

With the advent of next-generation sequencing, powerful measurements of mutation rates are now possible using whole-genome sequences of isolates either sampled from evolution experiments or derived from natural isolates of the same or related species. However, such estimates meet difficulties in distinguishing between selection and neutral processes. Our experimental approach has enabled to monitor the occurrence of mutations within the same mutational target sequence (*lacI* or *pheA*) at many different chromosomal locations. In this case the effect of selection on the fixation of mutations is the same irrespective of the chromosomal location of the target sequence. Based on the results of the comparison of the frequency of occurrence of Phe⁺ mutations in the *P. putida* chromosome either carrying the phe-lacI or pheA+C test system at 21 and 14 positions, respectively (Table 1, Table 2) we suggest that the occurrence of mutations varies in different chromosomal loci. Comparison of the spectra of *lacI* inactivating mutations in six chromosomal positions of the phe-lacI test system revealed that these spectra were statistically significantly different from each other (Table 3, Table S7). These results altogether demonstrated that the occurrence of mutations is affected by the chromosomal location of the mutational target sequence. Several possible mechanisms may operate that can explain the differences observed in the current work.

Effect of Head-on Transcription and Replication on Mutation Frequency

We did not notice any correlation between frequencies of mutations and distance of the studied sites from the origin of replication. Our results are in agreement with the recently published results of the comparison of rate of frameshift mutations (the assay detects loss of A•T from (A•T)₈ repeat in chloramphenicol acetyl transferase gene) at different positions in the *E. coli* chromosome [16]. This work also demonstrated that mutation rate varies at different positions in the genome. However, in contrast to the assay used in [16] we observed higher mutation frequency when the direction of transcription of the mutational target gene was opposite to the direction of movement of the replisome in the chromosome and *vice versa*, lower Phe⁺ mutation frequency was accompanied with co-directional transcription and replication. This connection appeared either by testing the occurrence of the broad spectrum of mutations in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system in the chromosome or by monitoring one particular frameshift mutation in the range of pheA+C test system-carrying strains (Fig. 1, and Tables 1 and 2).

Several studies have indicated that co-directional transcription complexes do not impede replisome progression, whereas head-on collisions can result in replication fork arrest and may therefore induce DNA recombination and repair [44,45,46]. It has been suggested that the severity of replication fork arrest due to head-on transcription correlates with the level of expression and may cause

mutations especially within highly expressed genes [38,39]. Nevertheless, increased mutagenesis has been associated with head-on collisions also within genes that are transcribed at lower levels. For example, a recent *in vivo* study in *B. subtilis* demonstrated an increase in the *rpoB* mutation rate when the genomic region encoding the *rpoB* gene was inverted so that it was transcribed head-on to the replication [39]. Our observations on mutagenic processes taking place in *P. putida* chromosome support the idea that the head-on collisions between transcription and replication could elevate mutation frequency (Table 1 and 2). At the same time, it should be noted that the frequency of the accumulation of Phe⁺ mutants in the strain phe-lacI117 was also elevated if compared to the several other strains, although in this case the mutational target gene (*lacI* gene) was transcribed co-directional to the replication. Also, the orientation of the mutational target gene in the chromosome had no statistically significant effect in the emergence of Phe⁺ mutants in some other tester strains. These results imply that in addition to the effects caused by the co-directional or head-on orientations of RNA polymerase and the replisome, the rate of mutation in the distinct chromosomal sites might be affected by several other factors.

Asymmetry in Mutagenesis during Leading and Lagging Strand Replication

The differences between the leading and lagging-strand replication have suggested that the production of mutations is not equal in the two strands. Based on the analysis of mutations in *lacZ* gene in two orientations in the *E. coli* chromosome, the lagging strand has been proposed to be less mutagenic [9]. Additionally, the base composition of DNA strands may affect the occurrence of mutations.

(i) Frameshift mutations at homopolymeric runs. Frameshift mutations can occur as a result of template-primer slippage at homopolymeric runs or repetitive sequences [47,48]. *In vitro* experiments with eukaryotic DNA polymerases have shown that 1-bp frameshifts occur more frequently in runs of template pyrimidines (at runs of T or C) than in runs of purines (at runs of A or G) [37]. Additionally, asymmetry of frameshift mutagenesis during the leading and lagging-strand replication has been demonstrated in comparison of reversion of various *lacZ* alleles in two orientations in the *E. coli* chromosome showing that the frequency of occurrence of 1-bp frameshift at (C·G)₆ run within the *lacZ* allele was higher when the template of the leading strand contained the run of pyrimidines [10]. This model could also be applied to explain the differences in mutation frequency in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at various chromosomal sites. The pheA+C test system measures the occurrence of 1-bp deletions at the (C·G)₇ run starting in the *pheA* sequence at the position 221 relative to the translational initiator codon of this gene. The coding strand of the mutated *pheA* gene contains seven C nucleotides at this site. The effect of the orientation of the mutational target gene appeared most remarkably in the comparison of the frequency of accumulation of Phe⁺ mutations in the strains pheA+C_B and pheA+C_S. Specifically, these two strains contain the insertions of the test system into the same gene, *tnpS* (PP_2981), which encodes for cointegrase of the transposon Tn4652, but in different orientations (Fig. 1B). The insertion sites are very close to each other, separated only by 108 nucleotides. In the strain pheA+C_B the transcription of the mutational target gene *pheA* is opposed to the direction of the replication of the leading strand and the frequency of Phe⁺ mutations was significantly higher than that in the strain pheA+C_S in which the transcription of the *pheA* gene was co-oriented with the replication of the leading strand in the

chromosome. If the *pheA* gene is transcribed in the same direction as the replication fork movement (as it happens in the strain pheA+C_S, and also in the strains pheA+C_K, pheA+C_J and pheA+C_P expressing reduced Phe⁺ mutation frequency in comparison with a number of others), the template for the leading strand synthesis contains the G-nucleotide run, while in the opposite direction (as it happens in the strain pheA+C_B) the C-nucleotide run serves as the template. Thus, similarly to the above-mentioned studies [10,37] the higher frequency of the occurrence of Phe⁺ revertants in the strain pheA+C_B than in the strain pheA+C_S and also in some other strains could be explained by preferred occurrence of 1-bp deletions when the template of the leading strand contains pyrimidines.

(ii) Frameshift mutations at repetitive sequences. Among the mutations which inactivated the *lacI* repressor gene in our study, the largest fraction of mutations consisted of the deletions or insertions of the 4-nucleotide sequence CTGG which is tandemly repeated three times at the positions 592 to 604 in the *lacI* gene. The hotspot mutation at this site of the *lacI* gene has been demonstrated previously in *E. coli* [49,50,51]. Note that the numbering of nucleotide positions at the *lacI* sequence in the current work differs by 29 nucleotides from that used in the previous studies in *E. coli*: in the current study the first translated codon GTG is at position 1–3 instead of position 29–31. Interestingly, among the 12 phe-lacI strains analyzed by us, the CTGG insertions prevailed in the strains containing the CTGG template in the leading strand whereas the CTGG deletions occurred predominantly in the strains containing the CTGG template in the lagging strand (Table 3 and 4). The instability of tandem repeats has been attributed to DNA polymerase slippage at misaligned intermediates in which an extrahelical loop compromised of one or more repeat units is stabilized by the surrounding correct base-pairs [48,52]. However, slippage potentiated by the CTGG repeated sequence in the *lacI* gene was supposed to be not the only misalignment that predicts the hotspot event [50].

It has been suggested that replication-dependent deletions between direct repeats occur preferentially in the lagging strand due to an unequal probability to form hairpin structures [53]. Also, the results of the another study have demonstrated that both expansions and deletions of CTG repeats occur in *E. coli* in an orientation-dependent manner [54]. In that study the deletions occurred more frequently when the CTG template was in the lagging strand whereas expansions were more prominent when the CTGs were in the leading strand template. Thus, we suggest that analogously to the mechanisms proposed for the gain and loss of CTG repeats [54] the orientation-dependent effects observed in the present study could be explained by the preferred formation of the deletion intermediates when the CTGG repeat in the *lacI* sequence is in the lagging strand template.

Effect of Level of Transcription on Mutagenesis

There are several studies demonstrating that spontaneous mutation rate is proportional to the transcriptional level both in eukaryotic cells [55,56] and in bacteria [57,58,59,60,61]. Thus, it is possible that in addition to the effects of the orientation, the effects of the level of transcription of the mutational target gene influenced the frequency of Phe⁺ mutations in our studies. For example, the strains pheA+C_B and pheA+C_S differed significantly from each other not only by the frequency of the occurrence of Phe⁺ revertants but also by the level of the expression of the *pheA* gene. The Phe⁺ mutants which accumulated in the strain pheA+C_S grew slower than those emerged in the strain pheA+C_B due to the lower cellular amount of the phenol

monooxygenase PheA (Figure S1). The reason for the level of transcription of the *pheA* gene being reduced in the strain pheA+C_S is unclear. Although the direction of the transcription of the *pheA* gene opposed the direction of transcription initiated from the *tnpS* gene promoter in this strain, it is unlikely that transcription proceeding from the *tnpS* promoter could suppress transcription of the *pheA* gene. The pheA+C test system-carrying mini-transposon contains several other genes (e.g., those associated with tellurite resistance) in its other end, thereby separating the *pheA* gene from the *tnpS* promoter by a nearly 4-kb-long DNA segment.

In order to examine the possibility that the level of transcription of the mutational target gene could affect the frequency of mutations, the transcription of the mutational target gene in the pheA+C test system was placed under the control of IPTG-inducible *P_{lac}* promoter. The increased level of transcription of the mutational target gene had statistically significant effect on the frequency of occurrence of frameshift mutations in growing bacteria (Fig. 2). Thus, we suggest that in addition to the DNA strand bias (e.g., higher frequency of mutations when the template for the lagging strand synthesis contains the G-nucleotide run) and transcription and replication collisions, changes at the level of transcription of the mutational target gene may affect mutagenic processes at least in growing cells of *P. putida*.

Effect of Growth Phase of Bacteria on Mutagenic Processes in the Chromosome

We have monitored the occurrence of Phe⁺ mutations in the *P. putida* chromosome both in growing and in stationary-phase bacteria. Study of the dynamics of accumulation of Phe⁺ mutants revealed that after the initial fast period the emergence of Phe⁺ colonies onto selective plates decreased (Table 1 and Table 2). The decline in the accumulation of Phe⁺ mutants was more clearly visible with the pheA+C test system than that with the phe-lacI test system. The pheA+C test system scores only 1-bp deletions at the fixed position in the mutated *pheA* allele resulting in similar growth rate of Phe⁺ revertants on phenol minimal plates. Thus, the time-dependent emergence of Phe⁺ colonies on selective plates in *P. putida* carrying the pheA+C test system could reflect dynamics of the occurrence of mutations in the bacterial chromosome in growing and stationary-phase populations of *P. putida*. We suggest that the decline in the number of later-appearing Phe⁺ mutants might be caused by reduced replication of the chromosome under conditions of carbon starvation of bacteria.

The results of the current study differ remarkably from that observed by us previously with the plasmidial test systems when mutations accumulated onto selective plates at constant rate or even increased in starving populations of *P. putida* [29,36,62]. In these studies we have excluded the possibility that the copy number of the plasmid could be increased in starving bacteria, thereby facilitating occurrence of stationary-phase mutations. Thus, the differences in the dynamics of occurrence of mutations in the chromosome and in plasmid during prolonged incubation of *P. putida* on selective plates are not clear yet.

The usage of the phe-lacI test system enabled the simultaneous detection of a broad spectrum of mutations (Table 3, Table 5). The CTGG indels at the position 592 in the *lacI* gene were the most frequently detected mutations when the earlier-arising Phe⁺ colonies were investigated, whereas the -351 G-to-A transitions in the *lac* operator sequence prevailed among the late-arising Phe⁺ mutants (Table 5, Table S10). The Phe⁺ mutants carrying the -351 G-to-A transitions in the *lac* operator appeared in the reconstruction experiment onto phenol minimal plates one day later than those containing the CTGG indels, which demonstrates

that the *lac* operator mutants grow slower. Nevertheless, since the emergence of G-to-A transitions on selective plates in the mutagenesis assay was delayed by about 3 days in comparison with that of mutants that arose due to the CTGG indels, we suggest that the -351 G-to-A transitions occur preferentially in stationary-phase cells. The appearance of certain mutational hot spots especially in stationary-phase cells of *P. putida* has been observed also in our earlier studies when we employed plasmidial test systems for the detection of mutations [29,62]. A difference in the spectrum of mutations between stationary-phase and actively growing bacteria has been demonstrated also in *E. coli* using the FC40 system that detects reversion of the *lac* allele on F plasmid [28,29,30]. The results of the current work indicate that the occurrence of certain types of mutations preferentially in stationary-phase cells might be more general, encompassing mutagenic processes taking place also in the chromosome of *P. putida*.

Interestingly, our results imply that the occurrence of certain mutational hot spots especially in growing bacteria is affected by the chromosomal location of the mutational target sequence (Table 3 and 5 and Table S10). For example, two mutations in the *lacI* gene (the A nucleotide deletion at the position 221 and the G-to-T transversions at the position 754 of the *lacI* gene in the strains phe-lacI₁₁₇ and phe-lacI₁₀₅, respectively) were detected only in Phe⁺ mutants that emerged onto selective plates early, on days 3–5, but not later. The presence of strong positional effects in the occurrence of certain mutations particularly in growing cells is intriguing. In the light of the results presented in this study it is tempting to speculate that DNA replication complexes acting at different chromosomal locations in growing bacteria may contain different accessory factors which have dissimilar effects on the fidelity of DNA replication.

Effect of DNA-binding Proteins on Mutagenesis

Nucleoid-associated proteins (NAPs) and other DNA binding proteins (e.g., various transcription factors) fold bacterial chromosome into higher-order structures and alter the level of gene expression [63,64]. Mutations can occur during the chromosome replication and as a result of DNA repair synthesis carried out at the sites of DNA damage. It is possible that regional differences in chromosomal topology may cause unequal access of chromosomal regions to mutagenesis by influencing formation of DNA repair complexes and participation of specialized DNA polymerases in DNA synthesis.

Our current results demonstrate that the frequency of transposition of IS element IS1411 also varies at different chromosomal positions of *P. putida* (Table 3). To avoid potentially deleterious effect of transposition to the host genome, the frequency of transposition in a cell is down-regulated both by transposon-encoded and host-encoded factors. Transposition may be regulated by controlling transposase TnpA expression (transcriptional, translational, and/or posttranslational control mechanisms) and also by factors that affect the transposition process itself [65]. So far, little is known about the regulation of transposition of IS1411. The results of our previous studies indicate that transposition of IS1411 occurs through a circular intermediate [40]. We suppose that the process of circle formation and transposition of this IS element is replicative, since the copy of the element has always retained at its original location. The frequency of transposition of IS1411 increases with time of starvation in *P. putida* lacking stationary-phase sigma factor RpoS, indicating that expression of some factor(s) which down regulate IS1411 transposition activity require RpoS, and that activation of IS1411 needs some late-starvation signal [62]. In the current study we have detected the

insertions of *IS1411* into the *lacI* repressor gene both in early- and late-appearing mutants (Table 4 and Table S7). However, at certain chromosomal positions (e.g., in the strains phe-lacI₁₀₅ and phe-lacI₁₁₇ which exhibited the highest frequency of *IS1411* insertions) the transposition events were mostly detected among late-appearing mutants. The fact that the frequency of transposition of *IS1411* into the *lacI* gene varies at different chromosomal positions leads us to speculate that regional differences in nucleoid folding may also influence its transposition. It is known that the level of DNA supercoiling affects some transposition reactions [66,67]. The level of DNA supercoiling is regulated by the combined activities of topoisomerases and NAPs [68]. It is well established that the superhelical density of DNA varies according to the growth conditions and that this change involves differential expression and DNA binding of NAPs [63,64,68]. Such spatio-temporal changes in DNA topology may influence transposition of *IS1411*.

Concluding Remarks

Given the complexities of mechanisms of mutagenesis, none of the above-discussed mechanisms alone provides an explanation regarding the observed variation in the frequency of mutations at different chromosomal positions. In addition to the effects caused by the co-directional or head-on orientations of RNA polymerase and the replisome, the frequency of mutations at the distinct chromosomal sites might be affected by several other factors. In some cases (e.g., the occurrence of 1-bp deletions within the run of seven C-nucleotides and the preferred occurrence of CTGG insertions or deletions at the repeated sequence), an effect of DNA strand bias (leading or lagging strand replication) on the mutagenic processes was observed. Additionally, we cannot exclude the effect of the level of transcription. It is also noteworthy that certain mutational hot spots were detected only at particular chromosomal positions and especially in growing bacteria. Thus, it seems plausible that regional differences in chromosome structure and organization influence mutagenic processes in growing bacteria more strongly than previously assumed. At the same time, since the mutants continued to accumulate in starving populations of *P. putida*, some cells could still grow slowly and replicate their chromosome under the starvation conditions. Nevertheless, it is also possible that mutations in the chromosome of *P. putida* stationary-phase cells have mainly occurred during the course of DNA repair synthesis.

The fact that mutation frequency and spectrum of mutations vary across the bacterial chromosome could play an important role in divergence of bacterial populations in nature. Depending on the location of the potential target genes in the chromosome some mutational pathways may prevail over the others in the evolution of bacteria.

Experimental Procedures

Bacterial Strains, Plasmids and Media

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table S1 and primers for DNA amplification in Table S2. Complete medium was Luria-Bertani (LB) medium [69], and minimal medium was M9 [70]. Solid medium contained 1.5% Difco agar. Casamino acids (CAA) and glucose were added to the minimal medium at final concentrations of 0.2% and 10 mM, respectively. Phenol minimal plates contained 2.5 mM phenol as a sole carbon and energy source. Antibiotics were added at the following final concentrations: for *E. coli*, ampicillin at 100 µg ml⁻¹; for *P. putida*, tetracycline at 50 µg ml⁻¹, carbenicillin at 1500 to 3000 µg ml⁻¹, rifampicin 100 µg ml⁻¹,

and potassium tellurite at 70 µg ml⁻¹; for both organisms, kanamycin at 50 µg ml⁻¹. *E. coli* was incubated at 37°C and *P. putida* at 30°C. *E. coli* and *P. putida* were electrotransformed as described by Sharma and Schimke [71]. *E. coli* strains DH5α (Invitrogen), and CC118 λpir [72] were used for the DNA cloning procedures and HB101 [73] as a host for helper plasmid pRK2013 [74], necessary for the mobilization of non-conjugative plasmids.

Construction of Test Systems Detecting Occurrence of Mutations in *P. putida* Chromosome

The assay systems for the detection of mutations in the chromosome of *P. putida*, based on the activation of the phenol monooxygenase gene *pheA*, enable bacteria to use phenol as a sole source of carbon and energy. One of the test systems (phe-lacI) was constructed for the detection of broad spectrum of mutations either inactivating the *lacI* repressor gene or altering the *lac* operator sequence which negatively controls the transcription of the phenol monooxygenase gene *pheA* from the P_{lac} promoter. Another test system (pheA+C) was designed for the measurement of one specific mutation, deletion of one nucleotide within a run of seven C-nucleotides leading to the reversion of the reading frame of the *pheA* gene. Both test systems were randomly inserted into the chromosome of *P. putida* strain PaW85 [75,76] within a mini-Tn5 transposon.

For the construction of the phe-lacI test system, at first the DNA fragment containing the P_{lac} promoter and *lacI* repressor gene was cut from the plasmid pBRlacItac [77] using the restrictionase BamHI and inserted into pUC18NotKm to obtain plasmid pUC18NotlacI. The plasmid pUC18NotKm was constructed by inserting the Km-resistance gene from plasmid pUTmini-Tn5 Km2 [78] within the 1430-bp Eco47III-generated DNA fragment into the DraI-cleaved plasmid pUC18Not [72]. The restriction enzyme DraI cleaves pUC18Not three times, once at the beginning of the β-lactamase gene *bla* and twice downstream from this gene. Thus, this strategy enabled us to replace the *bla* gene sequence in pUC18Not with the Km-resistance encoding gene. The Ecl136II- and EcoRI-generated DNA fragment containing the *pheA* genes and IS element *IS1411* from the plasmid pEST1414 [29] was inserted into the Ecl136II- and EcoRI-cleaved plasmid pUC18NotlacI yielding the plasmid pUC18NotlacIpheBA. Then, pUC18NotlacIpheBA was cleaved with NotI to insert the *lacI*-P_{lac}-*pheA* cassette from pUC18NotlacIpheBA into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6 [79], resulting in the plasmid pUTlacIpheBA.

To construct the other mutation detection system pheA+C for the monitoring occurrence of 1-bp deletions, the *pheA* coding sequence was altered by inserting a single C nucleotide at position 221 relative to the translational initiator codon of this gene. The nucleotide insertion site already contained six C nucleotides. The frameshift mutation was performed by PCR amplification of the segment of the *pheA* gene from the plasmid pPU1930 [80] with primer pheABamei and the mutant primer pheAvi+1 (Table S2). The amplified DNA fragment was subcloned into the pBluescript KS(+) EcoRV site to obtain pKSpheA+C. The +1 frameshift mutation was verified by DNA sequencing. The mutated DNA fragment was thereafter inserted as XbaI- and AviII- generated fragment from pKSpheA+C into pPU1930 by replacing the original *pheA* sequence located between the XbaI and AviII sites to generate the plasmid pPUpheA+C. Thereafter, we inserted the constitutively expressed P_{GC} promoter and the *pheA* allele with +1 frameshift as the Ecl126II- and PvuII-generated fragment from pPUpheA+C containing into the Ecl136II-cleaved pUC18NotKm to obtain

the plasmid pUC18NotpheA+C. Finally, the plasmid pUC18-NotpheA+C was cleaved with NotI to insert the P_{GC} -*pheA*+C cassette into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6, yielding the plasmid pUTpheA+C.

The mutation detection system-carrying plasmids pUTlacI-pheBA and pUTpheA+C, which do not replicate in hosts other than *E. coli* strain CC118 λ pir, were conjugatively transferred into *P. putida* strain PaW85 by using the helper plasmid pRK2013 [74]. Transconjugants carrying random insertions of the test system within mini-Tn5 in the chromosome of *P. putida* were isolated. Integration of whole delivery plasmid into *P. putida* chromosome was excluded by testing transconjugants for resistance to carbenicillin. Only those sensitive to carbenicillin represented a true transposition event. Additionally, strains either carrying the phe-lacI or pheA+C test system in the chromosome were confirmed by PCR analysis.

Construction of Assay System for the Measurement of Effect of Transcription of the Mutation Target Gene on Mutation Frequency

To study the effect of the level of transcription of the mutation target gene on mutation frequency, we modified the pheA+C test system by placing the transcription of the mutated *pheA* allele under the control of IPTG-inducible P_{lac} promoter. At first, the Ecl136II- and PvuII-generated DNA fragment from pPUpheA+C containing the P_{GC} -*pheA*+C cassette was inserted into Ecl136II-cleaved pUC18NotlacI containing the P_{lac} promoter and *lacI* repressor gene, yielding the plasmid pUC18NotlacIpheA+C. Thereafter, pUC18NotlacIpheA+C was cleaved with NotI to insert the *lacI*- P_{lac} -*pheA*+C cassette from pUC18NotlacIpheA+C into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6 to obtain the plasmid pUTlacIpheA+C.

Arbitrary PCR

To identify the location of the mutation detection system inserted randomly into *P. putida* PaW85 chromosome within mini-Tn5 in various phe-lacI and pheA+C strains, arbitrary PCR and DNA sequencing were performed. PCR products were generated by two rounds of amplifications as described elsewhere [81]. In all cases, the chromosomal location of the test system was determined twice, by identifying the mini-Tn5-flanking chromosomal DNA sequences at both sides. Such double check ensured that the insertion sites were correctly determined and demonstrated that the insertion of the mini-Tn into the chromosome did not cause genetic rearrangements at the flanking DNA. In the first round of PCR, primers ARBtel1, ARBpheA1 or pheAvaljasARB1 and arbitrary primers ARB6 or ARB-cggca were used. Second-round PCR was performed with primers ARBtel2, ARBpheA2 or pheAvaljasARB2 and arbitrary primer ARB2. DNA sequencing of the PCR products with the primers ARBtel2, ARBpheA2 or pheAvaljasARB2 was performed by using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Terminator kit. The DNA sequencing reactions were analyzed with the Applied Biosystems 3730x1 DNA sequencer.

Comparison of Mutation Frequency in *P. putida* Strains Carrying the phe-lacI or pheA+C Test System in Different Chromosomal Locations

Conditions for the isolation of phenol-degrading Phe^+ mutants were the same as those described in our previous study when we isolated Phe^+ revertants which occurred due to point mutations [36,82]. About 1×10^7 to 4×10^7 cells of the tester strains derived from independent cultures that were grown overnight in liquid M9

medium containing glucose and CAA were plated onto phenol-minimal plates. Independent cultures of the *P. putida* tester strains were generated by growing cells to late logarithmic growth phase in M9 medium containing glucose and CAA, diluting this culture by 10^5 into fresh glucose and CAA-containing M9 medium, dispensing 2-ml aliquots into test tubes and allowing cells to reach saturation by growing cells for 18–20 h. The cells of the tester strains were mixed with approximately 1×10^9 scavenger cells derived from the wild-type *P. putida* strain PaW85.

We have previously shown with plasmidial test systems [29,36] that Phe^+ colonies appearing on phenol minimal plates on day 2 contained mutations that occurred before the plating in a growing culture, whereas colonies that emerged on selective plates on day 3 and later contained mutations that occurred after the cells were plated. Latter were called stationary-phase mutations. We expected that the growth of the Phe^+ mutants detected with chromosomal test systems could be slower compared to that measured previously for the Phe^+ mutants detected with plasmidial assay systems. In order to find out how long it would take for the appearance of Phe^+ colonies onto selective plates in our assays (i.e., to distinguish mutations occurring in growing cultures from those occurring after plating), we carried out reconstruction experiments by mixing about 100–200 cells of individual Phe^+ mutants picked up from selective plates on different days (on days 4 to 7) with 5×10^8 scavenger cells not containing the *pheA* gene and monitored the appearance of Phe^+ colonies on phenol minimal plates.

The frequency of Phe^+ mutations occurring in stationary-phase populations was determined per viable cells on the selective plates. The viability of the tester cells during incubation under long-term carbon starvation conditions was determined on the same plates that were used for the isolation of Phe^+ mutants. Small plugs were cut from the plates avoiding Phe^+ colonies. Bacteria from these plugs were suspended in M9 buffer, and dilutions were plated onto LB plates containing potassium tellurite to determine the number of colony forming units of the tester strain in starving populations. In the case of all tester strains studied, the viability of bacteria during the starvation did not decrease significantly.

The frequency of occurrence of Rif^r mutations in growing cells of different *P. putida* strains was performed as previously described [83] except that the *P. putida* cultures were grown in M9 medium supplemented with glucose and CAA. Emergence of Rif^r colonies was counted after 48 h of incubation to give enough time to grow up also for mutants expressing milder Rif^r phenotype. The frequency of Rif^r mutations was determined at least in 45 independent cultures for each *P. putida* strain. The median value for Rif^r mutants per 1×10^9 cells was calculated by using the Lea-Coulson method of the median [84].

DNA Sequence Analysis of the Phe^+ mutants

To characterize the spectrum of mutations in Phe^+ mutants isolated with the phe-lacI test system, we PCR-amplified the *lacI* gene and the *LacI* operator sequence by using the primers lacopRev and lacIloppsisse1. The same primers and lacI3, lacI3out and lacIOc2 primers were used for DNA sequencing by the above-described methodology. BioEdit and ClustalW2 programs were used for sequence comparison.

Statistical Analysis of the Results

The factorial ANOVA method and *post-hoc* Tukey HSD test were used to assess the variability of data in experiments comparing mutation frequency in different phe-lacI, pheA+C and P_{tac} -pheA+C strains. To obtain normal distribution, data were transformed to common logarithm, if it was necessary. To avoid taking common logarithm from zero, “1” was added for all

data. For statistical tests the significance level was set at $P < 0.05$. The calculations were performed using Statistica 10 software. The nonparametric Mann-Whitney U test was used for estimation of dependency of mutant frequency on the orientation of the mutational target gene. We grouped *P. putida* strains according to the direction of the target gene to the direction of movement of replisome. The group one contained the means of mutant frequency of the strains with co-directional and the group two that of the strains with head-on orientations of transcription of the target gene and movement of replisome.

The statistical significance of differences between the spectra of Phe⁺ mutations in strains carrying the phe-lacI test system in various chromosomal locations was determined by using the hypergeometric test algorithm described in Adams and Skopek [41] and Piegorsch and Bailer [85]. The software for performing the test [86] is available at http://www.ibiblio.org/dnam/des_hyhg.htm. All *P* values were based on 30000 iterations. A *P*-value of < 0.05 means that the spectra are different in a pairwise comparison, but since 6 mutational spectra were compared, a Bonferroni correction for multiple comparisons with a corrected significance level of 0.003 ($0.05/5 \times 6 \times 0.5$) should be applied. In pairwise comparison of individual sites in separate spectra the chi-square test of independence was performed by using a software program for statistical analyses (Statgraphics Centurion XV; Statpoint Inc.) and the significance level was set at $P < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 Western blot analysis of crude cell lysates prepared from *P. putida* strains using polyclonal anti-PheA antibodies. Cells were grown in LB liquid medium to optical density $A_{580} = 0.9$. Twenty micrograms of crude cell lysates were analysed. *P. putida* strain PaW85 has been used as a negative control. (DOC)

Figure S2 Effect of IPTG on the expression of phenol monooxygenase gene *pheA* in *P. putida* carrying the Ptac-pheA+C test system. Western blot analysis of crude cell lysates prepared from *P. putida* strain PaW85 (negative control) and Phe⁺ revertant of *P. putida* strain Ptac-pheA+C₂ by using polyclonal anti-PheA antibodies. 50 micrograms of crude cell lysates were analyzed. **A.** PheA expression in growing cultures: lane 1, size marker; lane 2, PaW85; lane 3, PaW85+ IPTG; lane 4, Ptac-pheA+C₂ Phe⁺; lane 5, Ptac-pheA+C₂Phe⁺ + IPTG. Cells were grown in M9 minimal medium in the presence of glucose and CAA. **B.** PheA expression in stationary-phase cells: lane 1, size marker; lane 2, PaW85; lane 3, PaW85+ IPTG; lanes 4 and 6, Ptac-pheA+C₂ Phe⁺; lanes 5 and 7, Ptac-pheA+C₂Phe⁺ + IPTG. Bacteria were incubated for 3 days on M9 minimal agar plates either in the presence of glucose (lanes 2–5) or in the absence of any carbon source (lanes 6 and 7). (DOC)

Table S1 Bacterial strains and plasmids used in this study. (DOC)

References

1. Maki H (2002) Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet* 36: 279–303.
2. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, et al. (2005) DNA repair and Mutagenesis. Second edition.: ASM Press, Washington, DC.
3. Marians KJ (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673–719.

Table S2 Oligonucleotides used in this study. (DOC)

Table S3 Location of the phe-lacI test system in *P. putida* PaW85 chromosome. (DOC)

Table S4 Location of the pheA+C test system in *P. putida* PaW85 chromosome. (DOC)

Table S5 The frequency of Rif^r mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations. (DOC)

Table S6 The frequency of Rif^r mutants in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system on different chromosomal locations. (DOC)

Table S7 Location of the Ptac-pheA+C test system in *P. putida* PaW85 chromosome. (DOC)

Table S8 Comparison of mutational spectra in strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations. (DOC)

Table S9 The results of pairwise comparison of mutation frequency at individual sites obtained with chi-square test. Only the results with $P < 0.005$ are shown. (DOC)

Table S10 Spectrum of Phe⁺ mutations on separate days in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system in various chromosomal positions. (DOC)

Table S11 Comparison of mutational spectra on different time periods in strains carrying the phe-lacI test system at various chromosomal locations. (DOC)

Table S12 The results of pairwise comparison of mutation frequency on different time periods at individual sites obtained with chi-square test. Only the results with $P < 0.005$ are shown. (DOC)

Acknowledgments

We thank Remus Th. Dame, Mariliis Tark-Dame and Signe Saumaa for their comments on this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK. Performed the experiments: TJ HI TI KT KU KM AT. Analyzed the data: TJ HI RT KT MK. Wrote the paper: MK RT.

6. Rodriguez C, Tompkin J, Hazel J, Foster PL (2002) Induction of a DNA nickase in the presence of its target site stimulates adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Jô Bacteriol* 184: 5599–5608.
7. Mirkin EV, Mirkin SM (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 13–35.
8. Frank AC, Lobry JR (1999) Asymmetric substitution patterns: a review of possible underlying mutational or selective mechanisms. *Gene* 238: 65–77.
9. Fijalkowska IJ, Jonczyk P, Tkaczyk MM, Bialoskorska M, Schaaper RM (1998) Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10020–10025.
10. Gawel D, Jonczyk P, Bialoskorska M, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2002) Asymmetry of frameshift mutagenesis during leading and lagging-strand replication in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 501: 129–136.
11. Maliszewska-Tkaczyk M, Jonczyk P, Bialoskorska M, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2000) SOS mutator activity: unequal mutagenesis on leading and lagging strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12678–12683.
12. Gawel D, Maliszewska-Tkaczyk M, Jonczyk P, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2002) Lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Jô Bacteriol* 184: 4449–4454.
13. Sharp PM, Shields DC, Wolfe KH, Li WH (1989) Chromosomal location and evolutionary rate variation in enterobacterial genes. *Science* 246: 808–810.
14. Mira A, Ochman H (2002) Gene location and bacterial sequence divergence. *Mol Biol Evol* 19: 1350–1358.
15. Hudson RE, Berghthorsson U, Roth JR, Ochman H (2002) Effect of chromosome location on bacterial mutation rates. *Mol Biol Evol* 19: 85–92.
16. Martina MA, Correa EM, Argarana CE, Barra JL (2012) *Escherichia coli* frameshift mutation rate depends on the chromosomal context but not on the GATC content near the mutation site. *PLoS One* 7: e33701.
17. Lind PA, Andersson DI (2008) Whole-genome mutational biases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17878–17883.
18. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, et al. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5: e1000344.
19. Baath E (1998) Growth Rates of Bacterial Communities in Soils at Varying pH: A Comparison of the Thymidine and Leucine Incorporation Techniques. *Microb Ecol* 36: 316–327.
20. Poulsen LK, Licht TR, Rang C, Krogfelt KA, Molin S (1995) Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Jô Bacteriol* 177: 5840–5845.
21. Foster PL (1999) Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu Rev Genet* 33: 57–88.
22. Rosenberg SM (2001) Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Genet* 2: 504–515.
23. Metzgar D, Wills C (2000) Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. *Cell* 101: 581–584.
24. Tenaillon O, Taddei F, Radman M, Matic I (2001) Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 152: 11–16.
25. Bjedov I, Tenaillon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, et al. (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* 300: 1404–1409.
26. Kivisaar M (2003) Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ Microbiol* 5: 814–827.
27. Roth JR, Kugelberg E, Reams AB, Kofoid E, Andersson DI (2006) Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy. *Annu Rev Microbiol* 60: 477–501.
28. Foster PL, Trimarchi JM (1994) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* 265: 407–409.
29. Kasak L, Hörak R, Kivisaar M (1997) Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3134–3139.
30. Rosenberg SM, Longerich S, Gee P, Harris RS (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* 265: 405–407.
31. Ambur OH, Davidsen T, Frye SA, Balasingham SV, Lagesen K, et al. (2009) Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 33: 453–470.
32. Erill I, Campoy S, Mazon G, Barbe J (2006) Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* 34: 66–77.
33. Goosen N, Moolenaar GF (2008) Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)* 7: 353–379.
34. Shuman S, Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* 5: 852–861.
35. Kivisaar M (2010) Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiol Lett* 312: 1–14.
36. Tegova R, Tover A, Tarassova K, Tark M, Kivisaar M (2004) Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 186: 2735–2744.
37. Kunkel TA (1986) Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro*. *Jô Biol Chem* 261: 13581–13587.
38. Pomerantz RT, O'Donnell M (2010) What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* 9: 2537–2543.
39. Srivatsan A, Tehranchi A, MacAlpine DM, Wang JD (2010) Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet* 6: e1000810.
40. Kallastu A, Horak R, Kivisaar M (1998) Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 180: 5306–5312.
41. Adams WT, Skopek TR (1987) Statistical test for the comparison of samples from mutational spectra. *Jô Mol Biol* 194: 391–396.
42. Benzer S (1961) On the Topography of the Genetic Fine Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 403–415.
43. Hodgkinson A, Eyre-Walker A (2011) Variation in the mutation rate across mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 12: 756–766.
44. Pomerantz RT, O'Donnell M (2008) The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. *Nature* 456: 762–766.
45. Mirkin EV, Mirkin SM (2005) Mechanisms of transcription-replication collisions in bacteria. *Mol Cell Biol* 25: 888–895.
46. Rudolph CJ, Dhillon P, Moore T, Lloyd RG (2007) Avoiding and resolving conflicts between DNA replication and transcription. *DNA Repair (Amst)* 6: 981–993.
47. Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69: 497–529.
48. Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, et al. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 77–84.
49. Farabaugh PJ (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274: 765–769.
50. Schaaper RM, Danforth BN, Glickman BW (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *Jô Mol Biol* 189: 273–284.
51. Bharatan SM, Reddy M, Gowrishankar J (2004) Distinct signatures for mutator sensitivity of *lacZ* reversions and for the spectrum of *lacI/lacO* forward mutations on the chromosome of nondividing *Escherichia coli*. *Genetics* 166: 681–692.
52. Streisinger G, Owen J (1985) Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109: 633–659.
53. Trinh TQ, Sinden RR (1991) Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in *E. coli*. *Nature* 352: 544–547.
54. Kang S, Jaworski A, Ohshima K, Wells RD (1995) Expansion and deletion of C/TG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nat Genet* 10: 213–218.
55. Kim N, Abdulovic AL, Gealy R, Lippert MJ, Jinks-Robertson S (2007) Transcription-associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication. *DNA Repair (Amst)* 6: 1285–1296.
56. Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9: 204–217.
57. Beletskii A, Bhagwat AS (1996) Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13919–13924.
58. Reimers JM, Schmidt KH, Longacre A, Reschke DK, Wright BE (2004) Increased transcription rates correlate with increased reversion rates in *leuB* and *argH* *Escherichia coli* auxotrophs. *Microbiology* 150: 1457–1466.
59. Fix D, Canugovi C, Bhagwat AS (2008) Transcription increases methylmethane sulfonate-induced mutations in *alkB* strains of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 7: 1289–1297.
60. Pybus C, Pedraza-Reyes M, Ross CA, Martin H, Ona K, et al. (2010) Transcription-associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *Jô Bacteriol* 192: 3321–3328.
61. Wright BE (2004) Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol* 52: 643–650.
62. Saumaa S, Tover A, Kasak L, Kivisaar M (2002) Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Jô Bacteriol* 184: 6957–6965.
63. Dillon SC, Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185–195.
64. Dame RT (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* 56: 858–870.
65. Nagy Z, Chandler M (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Res Microbiol* 155: 387–398.
66. Isberg RR, Syvanen M (1982) DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5. *Cell* 30: 9–18.
67. Pato ML, Banerjee M (1996) The Mu strong gyrase-binding site promotes efficient synapsis of the prophage termini. *Mol Microbiol* 22: 283–292.
68. Travers A, Muskhelishvili G (2005) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* 3: 157–169.
69. Miller JH (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
70. Adams MH (1959) Bacteriophages: Interscience Publishers Inc., NY.
71. Sharma RC, Schimke RT (1996) Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20: 42–44.
72. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal

- insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Jô Bacteriol* 172: 6557–6567.
73. Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Jô Mol Biol* 41: 459–472.
 74. Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1648–1652.
 75. Bayley SA, Duggleby CJ, Worsey MJ, Williams PA, Hardy KG, et al. (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* 154: 203–204.
 76. Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strompl C, et al. (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* 4: 912–915.
 77. Ojangu EL, Tover A, Teras R, Kivisaar M (2000) Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 182: 6707–6713.
 78. de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Jô Bacteriol* 172: 6568–6572.
 79. Sanchez-Romero JM, Diaz-Orejas R, De Lorenzo V (1998) Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 64: 4040–4046.
 80. Nurk A, Kasak L, Kivisaar M (1991) Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 102: 13–18.
 81. O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449–461.
 82. Saumaa S, Tover A, Tark M, Tegova R, Kivisaar M (2007) Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 189: 5504–5514.
 83. Jatsenko T, Tover A, Tegova R, Kivisaar M (2010) Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutat Res* 683: 106–114.
 84. Rosche WA, Foster PL (2000) Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20: 4–17.
 85. Piegorsch WW, Bailer AJ (1994) Statistical approaches for analyzing mutational spectra: some recommendations for categorical data. *Genetics* 136: 403–416.
 86. Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, Skopek TR (1994) Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis* 15: 2281–2285.
 87. Carnoy C, Roten CA (2009) The *diff/Xer* recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* 4: e6531.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kärt Ukkivi
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 19.11.1987)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Transkriptsiooni ja transkriptsiooniga seotud DNA reparatsiooni mõju
mutatsiooniprotsessidele bakteris *Pseudomonas putida*

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Maia Kivisaar
(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013 (*kuupäev*)